



**Naturalis**

Repositorio Institucional  
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



# Citogenética básica y evolutiva de Heterópteros fitófagos de interés agroeconómico de la Argentina

**Bressa, María José**

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Larramendy, Marcelo Luis  
Co-dirección: Papeschi, Alba Graciela

Facultad de Ciencias Naturales y Museo  
2003

Acceso en:  
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20120126000135>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



**Naturalis**

Repositorio Institucional  
FCNyM - UNLP



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO  
Cátedra de Citología

### **Tesis**

presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Naturales

## **CITOGENÉTICA BÁSICA Y EVOLUTIVA DE HETERÓPTEROS FITÓFAGOS DE INTERÉS AGROECONÓMICO DE LA ARGENTINA**

María José Bressa

Codirectora:

*Dra. Alba Graciela Papeschi*

Director:

*Dr. Marcelo L. Larramendy*

La Plata, 2003

*A Alejandra,*

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	<b>IV-VI</b>
<b>LISTA ORIGINAL DE PUBLICACIONES</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>1. Generalidades de Heteroptera</b>	<b>1</b>
1.1. Clasificación y filogenia	1-2
1.2. Características biológicas	2-5
1.3. Importancia agroeconómica de especies de las familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae para la Argentina	5-7
<b>2. Antecedentes Citogenéticos de Heteroptera</b>	<b>7-8</b>
2.1. Cromosomas holocinéticos	8-11
2.2. Comportamiento mitótico de los cromosomas holocinéticos	11
2.3. Orientación de los cromosomas meióticos	11-14
2.4. Comportamiento meiótico de los autosomas	14-17
2.5. Sistemas cromosómicos de determinación del sexo	17-18
2.6. Comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales	18-19
2.7. Cromosomas m	19-21
2.8. Cromosomas supernumerarios	21-22
2.9. Comportamiento meiótico de univalentes autosómicos	22-23
2.10. Mecanismos de evolución del cariotipo en Heteroptera	23-25
<b>3. Antecedentes Moleculares y Citogenético-Moleculares de Heteroptera</b>	<b>26-28</b>
<b>4. Generalidades de las Familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae</b>	<b>28</b>
4.1. Características biológicas	28-30
4.2. Antecedentes citogenéticos	30-31
<b>OBJETIVOS DEL ESTUDIO</b>	<b>32</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>33</b>
<b>5. Colección del Material</b>	<b>33-36</b>
<b>6. Citogenética Básica</b>	<b>37</b>
6.1. Fijación	37
6.2. Determinación taxonómica	37-38
6.3. Disección de las gonadas	38



6.4. Confección de preparados citogenéticos con hematoxilina férrica acética	38
6.5. Confección de preparados citogenéticos para posterior tinción con 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Feulgen e impregnación argéntica	39
6.6. Análisis citogenético	39-40
6.7. Análisis estadístico	40
<b>7. Estudios Molecular y Citogenético Molecular</b>	<b>40</b>
7.1. Fijación	40
7.2. Protocolos de extracción de ADN genómico total	40-45
7.3. Purificación adicional del ADN genómico total	46
7.4. Medición de la concentración de ADN genómico total	46
7.5. Electroforesis en geles de agarosa	46-48
7.6. Digestión con endonucleasas de restricción	48-49
7.7. Extracción y purificación de fragmentos de ADN genómico de geles de agarosa	49-50
7.8. Marcaje de la sonda utilizando nick-translation	50
7.9. Hibridación <i>in situ</i>	50-53
<b>8. Características y Condiciones de Endocría</b>	<b>53-54</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>9. Familia Coreidae</b>	<b>55</b>
9.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Atbaumastus haematicus</i> (Stål, 1859)	55-58
9.2. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer</i> Berg	58-59, 60
9.3. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Phthia picta</i> (Drury, 1770)	59-60
9.4. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Leptoglossus impictus</i> (Stål, 1859)	61-62
<b>10. Familia Largidae</b>	<b>61</b>
10.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Largus fasciatus</i> (Blanchard, 1843)	61, 63-65
10.2. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Largus rufipennis</i> Laporte, 1832	66-73
<b>11. Familia Lygaeidae</b>	<b>73</b>
11.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Lygaeus alboornatus</i> Blanchard, 1852	73-76

<b>12. Familia Pyrrhocoridae</b>	<b>77</b>
12.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Dysdercus albofasciatus</i> Berg, 1878	77-81, 82
12.2. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Dysdercus chaquensis</i> Freiberg, 1948	81, 83-88
12.3. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Dysdercus ruficollis</i> (Linnaeus, 1764)	88, 89-91
12.4. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Dysdercus imitator</i> Blöte, 1931	92-96
<b>13. Familia Rhopalidae</b>	<b>97</b>
13.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de <i>Jadera haematoloma</i> (Herrich-Schaeffer, 1847) y <i>Jadera sanguinolenta</i> (Fabricius, 1775)	97-104
<b>14. Estudios Moleculares y Citogenético-Moleculares</b>	<b>105</b>
14.1. Comparación de los diferentes métodos de fijación	106, 107
14.2. Resultados de los distintos protocolos de extracción utilizados	106, 108
14.3. Resultados obtenidos de la digestión de las muestras de ADN genómico total con diferentes endonucleasas de restricción	109-113
14.4. Resultados obtenidos de la purificación adicional de las muestras de ADN genómico total	114
14.5 Hibridación <i>in situ</i>	114-117
<b>DISCUSION</b>	<b>118-148</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>149-153</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>154</b>
<b>SOLUCIONES</b>	<b>155-156</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>157-158</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>159-170</b>

## RESUMEN

El presente trabajo de Tesis se basa en el estudio citogenético básico y evolutivo de especies de Heteroptera fitófagas de interés agroeconómico para nuestro país. Se analizó el complemento cromosómico y el desarrollo meiótico de las siguientes especies: *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer* Berg ( $2n = 19/20 = 16+2m+X0/16+2m+XX$ ), *Athaumastus baematicus* (Stål, 1859), *Leptoglossus impictus* (Stål, 1859) y *Phthia picta* (Drury, 1770) (las tres especies poseen  $2n = 21/22 = 18+2m+X0, 18+2m+XX$ ) (Coreidae); *Largus fasciatus* (Blanchard, 1843) y *Largus rufipennis* Laporte, 1832 (ambas con  $2n = 13/14 = 12+X0/12+XX$ ) (Largidae); *Lygaeus alboornatus* Blanchard, 1852 ( $2n = 12 = 10+XY/10+XX$ ) (Lygaeidae *sensu lato*); *Dysdercus albofasciatus* Berg, 1878 ( $2n = 12 = 10+neoXY/10+neoXX$ ), *Dysdercus chaquensis* Freiberg, 1948, *Dysdercus imitator* Blöte, 1931 y *Dysdercus ruficollis* (Linnaeus, 1764) (las tres especies con  $2n = 13/14 = 12+X0/12+XX$ ) (Pyrrhocoridae); *Jadera haematoloma* (Herrich-Schaeffer, 1847) y *Jadera sanguinolenta* (Fabricius, 1775) (ambas con  $2n = 13/14 = 10+2m+X0/10+2m+XX$ ) (Rhopalidae).

En este trabajo se han encontrado alteraciones numéricas y estructurales en las especies analizadas de las familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae y Pyrrhocoridae. Teniendo en cuenta el número cromosómico diploide modal para Coreidae, en *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer* se observó una fusión autosómica que trajo aparejado una reducción del número de pares de autosomas. Los resultados obtenidos en *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae) muestran que esta especie posee el número cromosómico diploide más bajo mencionado hasta el presente para la subfamilia Lygaeinae, el cual se habría originado a partir del complemento cromosómico diploide atávico a través de una fusión autosómica. En la población de *Largus fasciatus* (Largidae) se encontró un individuo portador de un cromosoma B, mientras que en una población de *Dysdercus albofasciatus* (Pyrrhocoridae) cuatro especímenes presentaron un cromosoma supernumerario, que por sus características se habría originado a partir de un autosoma. En una población de *Largus rufipennis* (Largidae) se encontró un individuo portador de una translocación recíproca desigual entre dos cromosomas no homólogos de tamaño mediano. Finalmente, se encontraron individuos con alteraciones en los cromosomas sexuales en especímenes de *Jadera sanguinolenta* y *J. haematoloma*, los que presentaron un polimorfismo cromosómico en relación con el tamaño del cromosoma sexual.

Con respecto a los sistemas cromosómicos de determinación del sexo en Heteroptera, se encontró un sistema sexual neo-XY en *Dysdercus albofasciatus*, que es original para el género, así como para la familia Pyrrhocoridae, y para Heteroptera en virtud de su origen.

En la meiosis de Heteroptera es característico que luego de paquitene siga el estadio difuso, el cual presenta diferencias entre las especies. En *Dysdercus chaquensis* (Pyrrhocoridae) se observó la ausencia de este estadio únicamente en especímenes pertenecientes a una población endocriada, mientras que estaba presente en poblaciones naturales.

La aplicación de la técnica de impregnación argéntica a células meióticas de *Dysdercus imitator* (Pyrrhocoridae) permitió observar la presencia de varios cuerpos prenucleolares a lo largo de toda la meiosis. El ciclo peculiar del nucléolo pudo relacionarse con características del ciclo de vida de la especie.

Se realizó la extracción de ADN genómico total a partir de ejemplares enteros de *Athaumastus haematicus*, *Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer*, *Leptoglossus impictus*, *Phthia picta* (Coreidae), *Largus fasciatus*, *Largus rufipennis* (Largidae), *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae), *Dysdercus albofasciatus*, *Dysdercus chaquensis*, *Dysdercus imitator*, *Dysdercus ruficollis* (Pyrrhocoridae) y *Jadera sanguinolenta* (Rhopalidae), mediante cuatro métodos distintos de extracción. El análisis comparativo de los resultados obtenidos con cada uno de ellos mostró que la conservación de los especímenes en nitrógeno líquido (-196°C) sería el procedimiento más apropiado para el estudio molecular y que el tratamiento con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico resultó ser el más satisfactorio para efectuar extracciones de ADN genómico total.

Un método de purificación adicional se aplicó a las distintas muestras de ADN genómico total mediante la precipitación con espermina. Los datos resultantes permiten señalar que este método de purificación adicional no contribuyó significativamente a remover posibles sustancias extraídas junto con el ADN.

Los resultados de la digestión con endonucleasas de restricción de corte frecuente (Alu I, Hinf I, Hae III, Taq I) y de corte infrecuente (BamH I, Bgl II, EcoR I, EcoR V, Hind III, Pst I, Sma I, Sal I, Xba I) mostraron, por un lado, que las endonucleasas reconocieron sitios específicos de corte y, por el otro, que en ninguna de las especies estudiadas se observó la aparición de un patrón de bandas específicas. Estos resultados permiten poner en evidencia que sustancias contaminantes, tales como polisacáridos, polifenoles, pigmentos, podrían interferir con la extracción y purificación del ADN, obteniéndose como resultado un ADN de muy baja pureza que no podría ser empleado en posteriores técnicas moleculares.

Durante la extracción de ADN genómico total de ejemplares de *Jadera sanguinolenta* (Rhopalidae) se obtuvieron cuatro bandas de ADN de distintos pesos moleculares, sin digestión con enzimas de restricción. Los resultados obtenidos del empleo de estos fragmentos eluidos como sondas o marcadores genéticos mediante la técnica de hibridación *in situ* sobre cromosomas

de células meióticas de *J. sanguinolenta* revelaron la presencia de señales de hibridación localizadas en la cromatina de estas células.

Finalmente, los datos obtenidos a partir de los estudios citogenéticos y citogenético-moleculares contribuyen a ampliar los conocimientos existentes sobre las especies de Heteroptera, a interpretar la historia evolutiva y a inferir hipótesis acerca de algunos mecanismos adaptativos y evolutivos involucrados en el origen de las variaciones intra e interpoblacionales en las especies.

## LISTA ORIGINAL DE PUBLICACIONES

La presente Tesis Doctoral dio lugar a los siguientes trabajos publicados, los cuales son referidos en el texto a través de sus correspondientes números romanos.

- I. Bressa, M. J.; Papeschi, A. G.; Mola, L. M. & Larramendy, M. L. 1998. Meiotic studies in *Largus rufipennis* (Castelnau) (Largidae, Heteroptera). II. Reciprocal translocation heterozygosity.  
**Caryologia** 51 (3-4): 253-264
- II. Bressa, M. J.; Papeschi, A. G.; Mola, L. M. & Larramendy, M. L. 1999. Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). I. Neo-XY in *Dysdercus albofasciatus* Berg 1878, a new sex chromosome determining system in Heteroptera.  
**Chromosome Research** 7 (7): 503-508.
- III. Bressa, M. J.; Papeschi, A. G.; Mola, L. M. & Larramendy, M. L. 2001. Autosomal univalents as a common meiotic feature in *Jadera haematoloma* (Herrich-Schaeffer, 1847) and *Jadera sanguinolenta* (Fabricius, 1775) (Heteroptera, Rhopalidae: Rhopalinae)  
**European Journal of Entomology** 98: 151-157.
- IV. Bressa, M. J.; Papeschi, A. G. & Larramendy, M. L. 2002. Meiotic studies in *Lygaeus alboornatus* Blanchard 1852 (Heteroptera, Lygaeidae: Lygaeinae)  
**Caryologia** 55: 15-19.
- V. Bressa, M. J.; Fumagalli, E.; Ituarte, S.; Frassa, M. V. & Larramendy, M. L. 2002. Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville, 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). II. Evidence of variations in the diffuse stage between wild and laboratory inbred populations of *Dysdercus chaquensis* Freiberg, 1948  
**Hereditas** 137: 125-131.

## INTRODUCCION

### 1. Generalidades de Heteroptera

Los primeros restos fósiles de insectos alados provienen del piso inferior del Carbonífero Superior, incluyendo aquellos provenientes de localidades como Comestry, Westphalia, la Cuenca de Kuznesk y Mazon Creek (Illinois, E.E.U.U) (Davies 1991). En particular, los representantes de Heteroptera probablemente surgieron a partir de antepasados Protohomópteros antes del Pérmico, hace aproximadamente 280 millones de años (Richards & Davies 1983a). Según Kukalová-Peck (1991), los primeros heterópteros datan del Pérmico inferior y la gran diversificación ocurre en el Mesozoico en asociación con la emergencia de las plantas con flores, a partir de líneas provenientes de los continentes Pangea, Laurasia o Gondwana (Schuh & Slater 1995). Aunque los detalles de su origen no son claros, Schlee (1969) considera que Peloridiidae (Homoptera) y Heteroptera tendrían un antepasado común. Las Actinoscytidae (Pérmico Superior y Triásico), Ipsviciidae y Dunstaniidae (ambos Triásico) están entre los primeros heterópteros fósiles; Heteroptera tiene además numerosos representantes del Jurásico y Cretácico. No obstante, estos fósiles no han contribuido en gran medida a las teorías sobre la filogenia de Heteroptera, la cual depende ampliamente de las deducciones inferidas a partir de aspectos de la morfología y la taxonomía de las familias actuales (Richards & Davies 1983a).

#### 1.1. Clasificación y filogenia

Las primeras clasificaciones de los Heteroptera se basaron en un único carácter morfológico, como son la estructura de las alas o las piezas bucales. De este modo, Linnaeus (1758) fue el primero en incluir a las chinches verdaderas junto con las cochinillas, áfidos y pulgones dentro del grupo taxonómico superior Hemiptera, basándose en la estructura de las alas. Además, reconoció la estructura característica del rostro de los hemípteros, subdividiendo al grupo en aquellos insectos con el rostro curvado (chinches verdaderas) y con el “rostrum pectorale” (pulgones y otros Sternorrhyncha). Por su parte, Fabricius (1803) ubicó a estos insectos en su grupo Rhyngota y reconoció 29 géneros, mientras que el naturalista francés Latreille utilizó el término Hemiptera de Linnaeus para referirse al taxón Rhyngota de Fabricius. En 1810, Latreille (1810) designó formalmente a los subgrupos Homoptera y Heteroptera y, con posterioridad, subdividió a Heteroptera en Geocorisae e Hydrocorisae basándose en la estructura

de la antena. Cinco décadas después, Fieber (1861) introdujo los términos descriptivos *Gymnocerata* y *Cryptocerata* para *Geocorisae* e *Hydrocorisae*, respectivamente. La primera clasificación más inclusiva sobre las familias de Heteroptera fue publicada por Amyot y Serville en 1843 (1843). Aunque muchos de los nombres incluidos han entrado en desuso por ser descriptivos, la clasificación de Amyot y Serville fue un avance fundamental para la nomenclatura moderna de las familias de Heteroptera. Por último, cabe destacar que no todos los autores subsiguientes utilizaron dicha nomenclatura; por ejemplo, el término Hemiptera ha sido aplicado por los autores norteamericanos para denominar a las chinches verdaderas (subgrupo Heteroptera de Latreille) como un orden coordinado con Homoptera, mientras que la mayoría de los autores europeos han considerado a los términos Heteroptera y Homoptera como dos subgrupos dentro del grupo Hemiptera, y los autores modernos como Borror, Triplehorn y Johnson (1989) han argumentado que el taxón Heteroptera debería ser denominado Hemiptera y ser tratado al nivel taxonómico de orden (Schuh & Slater 1995). Si bien no existe un acuerdo completo entre los especialistas sobre el sistema de clasificación, Schuh y Slater (Schuh & Slater 1995) reconocen como grupos monofiléticos a Hemiptera *sensu lato*, Coleorrhyncha y Heteroptera, y se refieren a ellos con términos que proceden de larga data, independientemente de su categoría taxonómica.

La clasificación utilizada en el presente Trabajo de Tesis Doctoral corresponde a la descrita por estos últimos autores (Schuh & Slater 1995).

## 1.2. Características Biológicas

Los heterópteros se caracterizan morfológicamente por presentar una cabeza de disposición prognata, ojos compuestos generalmente bien desarrollados y dos ocelos ubicados entre o detrás de los ojos compuestos en el estado adulto. Además, poseen una gula muy desarrollada y esclerotizada, una región clipeal más o menos prominente y un labro de forma triangular por debajo de ella (Richards & Davies 1983a, Schuh & Slater 1995). El aparato bucal es de tipo picador-suctor con cuatro estiletes, adaptado para perforar los tejidos animales o vegetales y chupar sus fluidos. El primer par de estiletes son las mandíbulas, externas, que pueden estar dentadas en su extremo y el segundo par son las maxilas, internas, que no poseen palpos maxilares. Las mandíbulas son los principales órganos perforadores y a continuación, las maxilas se introducen en la picadura funcionando como una estructura de una sola pieza. Durante el reposo los estiletes están envueltos por el labio tubular, que puede ser recto o curvo, con tres o



cuatro segmentos, y carece de palpos labiales (Richards & Davies 1983a, Davies 1991, Schuh & Slater 1995). Las antenas de los heterópteros están constituidas por escapo, pedicelo, basiflagelo y distiflagelo; sin embargo, puede tener lugar la formación o subdivisión de escleritos adicionales durante el desarrollo postembrionario, como así también, la pérdida o fusión de segmentos (Schuh & Slater 1995).

En el tórax, el par anterior de alas puede presentar una textura uniforme o tegminal, como en los grupos filogenéticamente más primitivos, o puede ser en forma de hemiélitro, que se caracteriza por estar dividido en una porción anterior de naturaleza coriácea y una porción posterior membranosa; con respecto al par posterior, es de naturaleza exclusivamente membranosa en todos los integrantes que lo presentan. Asimismo, este par de alas membranosas está frecuentemente sujeto a una disminución sustancial de su tamaño, o incluso su pérdida total. En reposo, las alas se disponen horizontalmente sobre el cuerpo con los ápices superpuestos (Schuh & Slater 1995). Las patas de los heterópteros muestran una notable diversidad estructural dentro y entre los grupos, correlacionada en gran parte con los hábitos de vida; entre ellas podemos mencionar patas cursoriales, natatorias, raptoras y fosoriales (Schuh & Slater 1995).

La estructura más simple del abdomen pregenital en Heteroptera consiste de 7 segmentos en las hembras y de 8 en los machos. La armadura genital del macho consiste de una cápsula genital o pigóforo conteniendo al falo en su interior, que está usualmente compuesto de un aparato basal articulado al cual se unen el órgano intromitente o edeago y los parámetros o claspers. El conducto eyaculador pasa a través del foramen basal hacia el lumen del órgano intromitente, dentro del cual forma el conducto seminífero. Este conducto puede estar modificado en la región proximal formando un reservorio eyaculador o vesícula seminífera. Los testículos normalmente están formados por 2 a 7 folículos testiculares. En cada folículo testicular se pueden distinguir la zona del germario, donde se encuentran las células germinales primordiales o espermatogonias; la zona de crecimiento, donde las espermatogonias aumentan de tamaño, experimentan mitosis y se transforman en espermatocitos; la zona de división y reducción, donde tiene lugar la meiosis y los espermatocitos dan lugar a las espermátidas y por último, la zona de transformación donde las espermátidas se diferencian en espermatozoides. Las hembras poseen un par de ovarios formados frecuentemente por un número variado de ovariolas acrotróficas, desde 2 hasta 17, en donde las células nutritivas están confinadas a la región apical o del germario, y quedan conectadas con los oocitos por medio de cordones citoplasmáticos (Richards & Davies 1983a, De La Fuente 1994, Schuh & Slater 1995). De cada ovario parte un oviducto y ambos confluyen sobre la línea media del cuerpo, fusionándose en un oviducto impar común. En este oviducto puede diferenciarse la espermateca o reservorio de almacenamiento del

esperma, que está presente primitivamente en Heteroptera y presenta una estructura característica y diversa de un grupo a otro (Pendergrast 1957, De La Fuente 1994, Schuh & Slater 1995). El ovipositor está compuesto por las valvas o gonapófisis anteriores y posteriores, usualmente fusionadas a las primeras y segundas valvíferas o gonocoxas, respectivamente (Schuh & Slater 1995).

La reproducción sexual en Heteroptera es anfigónica y en su gran mayoría son ovíparos, aunque el viviparismo se presenta en Polytetidae (Cimicoidea). Los huevos muestran una considerable diversidad de forma y estructura coriónica y difieren en los mecanismos de respiración, fecundación y eclosión (Rizzo 1976, Richards & Davies 1983a). El desarrollo postembrionario es gradual y la metamorfosis es directa denominándose heterometabolía. Las fases inmaduras o estadios ninfales son muy similares en el aspecto general y en la forma de vida a los adultos, hablándose en este caso de paurometabolía. La mayoría de los heterópteros pasa por cinco estadios ninfales antes de alcanzar el estado adulto. Las ninfas sólo difieren del adulto por presentar un desarrollo incompleto de las alas y de los genitales, coloraciones a veces diferentes y durante el primer estadio viven en forma frecuentemente gregaria para luego dispersarse. Además, presentan ojos compuestos, aumentan gradualmente de tamaño en cada muda y el aparato bucal y los hábitos casi siempre son similares a los del adulto (Richards & Davies 1983a).

La mayoría de las chinches presentan glándulas odoríferas o repugnatorias de disposición dorsal en el abdomen de los estadios ninfales, que se abren al exterior a través de cuatro ostíolos, y de disposición ventrolateral en el tórax de los adultos, en los cuales se comunican al exterior por medio de dos ostíolos ubicados en las metapleuras (Schuh & Slater 1995). Las secreciones son repelentes y, en cantidad suficiente, pueden paralizar predadores potenciales al entrar en el sistema traqueal, aunque los heterópteros que las producen son ampliamente resistentes a sus efectos. En algunas especies estas glándulas se encuentran sólo en los machos, lo cual sugiere que sus secreciones pueden tener un papel epigámico (Richards & Davies 1983a).

El tiempo evolutivo extenso de Heteroptera y su aparente adaptabilidad han dado como resultado una extrema diversidad estructural y biológica, evidenciada por ser el grupo más grande y diverso de insectos con metamorfosis directa. La mayoría de sus 75 familias, con más de 38.000 especies nominales conocidas hasta el presente, se hallan distribuidas en numerosas islas y en todos los continentes, excepto en el Antártico (Schuh & Slater 1995). Ningún otro gran grupo de insectos ha utilizado tan exitosamente la enorme variedad de hábitats como lo ha hecho Heteroptera. Algunas especies presentan una relación de comensalismo con hormigas y termitas e incluso, otras conviven con arañas. Hay especies adaptadas a vivir en el medio acuático, mientras

que otras habitan la superficie del agua; ciertas especies viven como parásitos de aves y mamíferos y hay muchas especies que predan a otros artrópodos (Schuh & Slater 1995).

Entre los hábitos de alimentación presentes en Heteroptera, se pueden mencionar especies fitófagas, predadoras y hematófagas, siendo fitófagos la mayoría de los representantes de este grupo (Schuh & Slater 1995). Por otro lado, numerosas especies predadoras se alimentan de otros insectos o de otros artrópodos, como por ejemplo la mayoría de los miembros de Geocorinae; y finalmente las especies hematófagas se alimentan de sangre de vertebrados, destacándose algunas especies de Triatominae que son vectores de la enfermedad de Chagas en América del Sur (Schuh & Slater 1995). Las principales características adaptativas que exhiben estos insectos en sus diversos hábitos fitófagos son: la estructura de sus piezas bucales y el mecanismo que emplean para ingerir el alimento, los procesos sensoriales y de comportamiento que utilizan para seleccionar o reconocer su alimento, y la fisiología de su sistema digestivo, incluyendo las enzimas, los mecanismos de degradación y la asociación con microorganismos simbióticos implicados en la digestión y nutrición (Davies 1991). Una característica sorprendente de las relaciones entre insectos y plantas es la preferencia que tienen muchos de ellos por una gama muy restringida de ellas, lo que a veces implica un alto grado de especificidad entre el hospedador y el huésped (Davies 1991). Sin embargo, existen al mismo tiempo algunas especies que pueden vivir y desarrollarse con éxito sobre una amplia gama de vegetales (Davies 1991). Los mecanismos de selección de huésped son numerosos y muestran claras diferencias de una especie a otra, pero los componentes implicados más importantes son las respuestas a los estímulos visuales, olfativos y gustativos, y algunos de ellos pueden actuar a distancias de varios metros, mientras que otros actúan a distancias menores o sólo son efectivos una vez que el insecto ha efectuado una prueba alimentaria (Davies 1991). Si bien no todas las especies fitófagas deben ser consideradas plagas, gran parte de las estudiadas hasta el presente sí lo son y varias se caracterizan por atacar plantas cultivadas de gran valor económico (Leach 1940, Carter 1962).

### **1.3. Importancia Agroeconómica de especies de las familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae para la Argentina**

Los insectos heterópteros fitófagos producen enormes daños al alimentarse de las distintas partes de las plantas, principalmente tallos jóvenes, yemas, capullos, flores, semillas y hojas, los cuales involucran el deterioro parcial o generalizado de la planta, pudiendo conducir a la muerte del vegetal. Este daño es causado básicamente por la inoculación sobre el vegetal de bacterias y/o virus, los que

en forma secundaria producen y agravan el efecto deletéreo, o por la succión de savia durante el proceso de alimentación, lo que puede producir clorosis, acción irritante o tóxica (Davies 1991). Varias especies de las familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae son verdaderas plagas de cultivos de gran valor agroeconómico para nuestro país.

Dentro de la familia **Coreidae**, varias especies de los géneros cosmopolitas *Leptoglossus* y *Leptocoris* atacan a los cultivos de algodón, tomate, papa, zapallo, arroz, naranja y durazno, produciendo pérdidas anuales considerables (Bosq 1937, 1940, Rizzo 1976). En particular, *Leptoglossus impictus*, vulgarmente conocida como "chinche foliada" o "chinche de la papa", tiene una amplia distribución en nuestro país y ocasiona daños de importancia en Solanáceas, ya que por efecto de su ataque el follaje de las plantas se seca parcial o totalmente (Bosq 1937, 1940, Rizzo 1976). La especie *Athaumastus haematicus*, conocida como "chinche roja", "chinche sanguinolenta" o "chinche del poroto", se distribuye desde Río Negro hasta el norte argentino y es una chinche que frecuentemente se encuentra en cultivos hortícolas y en algunos industriales. Entre sus plantas huéspedes cultivadas cabe mencionar girasol, zapallo, acelga, batata, maíz, soja, poroto, tomate, tabaco, alfalfa y papa. Los daños registrados se refieren principalmente a marchitamiento de hojas y brotes, que pueden llevar a la considerable disminución de los rendimientos (Bosq 1937, 1940, Rizzo 1976). Entre los hospedadores de la "chinche del tomate" o *Phthia picta*, cabe mencionar al tomate, varias especies del género *Solanum* y las cucurbitáceas. Al penetrar con sus estiletes bucales a los frutos del tomate los irritan, rajan y secan; además, pueden provocar el marchitamiento de los brotes (Rizzo 1976).

Entre las numerosas especies del género *Largus*, pertenecientes a la familia **Largidae**, sólo algunas perjudican plantas cultivadas en nuestro país. *Largus fasciatus* ha sido encontrada en los cultivos de duraznos, la chilca y los alfalfares. Al succionar los frutos maduros del durazno provoca la podredumbre o destrucción de la planta por acción de otros parásitos, que penetran a través de las perforaciones producidas por los estiletes bucales. *Largus humilis* es una especie polífaga, que ha sido encontrada sobre *Senecio brasiliensis*, batata y árboles frutales; *Largus rufipennis* ataca al tabaco y también ha sido encontrado sobre *Senecio brasiliensis*.

Desde el punto de vista agrícola, dentro de la familia **Lygaeidae** es importante destacar a *Nysius simulans*, "chinche diminuta" o "chinche pequeña", especie que se alimenta de la savia de diversas plantas cultivadas, especialmente de la papa. Además, suele atacar los cultivos de algodón, arroz y maíz y las plantas silvestres. Aunque sus daños por lo general pasan inadvertidos, cuando sus ataques son intensos se observa un desmejoramiento de los cultivos. Su daño radica fundamentalmente en la transmisión y difusión de enfermedades virales a través de sus picaduras, muy comunes en cultivos de papa. Otra especie del mismo género *N. major*, conocida como

"chinche mayor", suele encontrarse en cultivos de papa, lechuga, alfalfa, entre otros, y en la vegetación silvestre. Por otra parte, *Blissus bosqi* produce en las gramíneas manchas cloróticas características por la inoculación de saliva altamente tóxica para las hojas que ataca, y se halla distribuida en Buenos Aires, delta del Paraná e isla Martín García (Bosq 1937, 1940, Rizzo 1976).

En la familia **Pyrrhocoridae**, casi todas las especies del género *Dysdercus* son consideradas plagas importantes para la agricultura del país. Se han encontrado ejemplares de *Dysdercus chaquensis* alimentándose no sólo del algodón sino también de otras malváceas y de palo borracho. Entre sus efectos más importantes se encuentran la introducción de bacterias y esporos en los capullos inmaduros, que conducen a su podredumbre interna general, y la tinción de las fibras por una estigmatomicosis. Esta enfermedad es producida por hongos y bacterias, señalándose en especial al hongo *Nematospora gossypii* Ashly & Nowell, siendo la chinche portadora mecánica de los esporos de este hongo (Bosq 1937, 1940, Rizzo 1976). Por el contrario, si el ataque se produce sobre los capullos abiertos, el insecto al succionar las semillas extrae aceite y con sus deyecciones mancha al algodón (Da Costa Lima 1940). De modo semejante, *Dysdercus longirostris* ataca a los naranjos y al introducir sus estiletes en las cáscaras de los frutos los lesiona al alterar su color en torno a las perforaciones. Además, induce a una podredumbre prematura del fruto debido a la introducción de esporos de *Penicillium italicum* Wehmer y *P. digitatum* Sacc.; las pérdidas que llega a ocasionar son mayores de 20% por cajón de fruta estacionado (Gomez 1938).

Al nivel de los **Rhopalidae**, una especie de amplia distribución desde América del Norte hasta Patagonia es *Corizus (Niesthrea) sidae* (Fabricius) *pictipes* (Stål), llamada vulgarmente "chinche negra de la alfalfa". Si bien esta especie puede ser encontrada en el algodón y en otros cultivos, generalmente vive sobre la pradera natural perjudicando los pastos tiernos, y cuando invade los alfalfares, perjudica en forma apreciable los rendimientos de heno y muy principalmente la cosecha de semilla. En este grupo cabe mencionarse además *Jadera sanguinolenta* encontrada en abundancia sobre el algodón y la alfalfa (Bosq 1937, 1940, Rizzo 1976).

## 2. Antecedentes Citogenéticos de Heteroptera

Los estudios citogenéticos en Heteroptera se iniciaron cuando Henking (1891), a través de sus estudios sobre la meiosis masculina de *Pyrrhocoris apterus* (Pyrrhocoridae), señaló la presencia de un elemento cromatínico peculiar, el cromosoma sexual, el cual mostraba un comportamiento diferente del de los demás cromosomas durante la espermatogénesis, de manera que al final del proceso meiótico se formaban dos clases de espermátidas, unas con 11 cromosomas y otras con

12 cromosomas, uno de los cuales era el aludido “elemento cromatínico peculiar”. A principios del siglo XX, Montgomery (1901a, b, 1906) y Wilson (1905a, b, 1906, 1909a, c, 1911, 1912), así como Gross (1904a, b, 1907, 1912), Foot y Strobell (1907a, b, 1912, 1914), Payne (1909, 1910, 1912) y Browne (1910, 1913, 1916), entre otros, contribuyeron de manera sustancial a los estudios citogenéticos en Heteroptera, brindando numerosos aportes para el conocimiento sobre la estructura y organización de sus cromosomas, la constitución cromosómica y su comportamiento durante la división celular de aproximadamente 1.200 especies pertenecientes a 46 familias. A su vez, proporcionaron el ímpetu necesario para los estudios citogenéticos posteriores en Heteroptera (Ueshima 1979, Manna 1984). Sobre la base del número de especies descriptas taxonómicamente dentro de Heteroptera, se desprende que los antecedentes desde el punto de vista citogenético constituyen una verdadera limitación para establecer relaciones evolutivas entre los diversos taxa, debido a que la información disponible es escasa para muchas familias, mientras que para otras es heterogénea, e incompleta (Manna 1984).

## 2.1. Cromosomas holocinéticos

Una de las particularidades citogenéticas más importantes de Heteroptera es el carácter holocinético de sus cromosomas. Los cromosomas holocinéticos se caracterizan por carecer de una constricción primaria y, por lo tanto, de un centrómero localizado. Si bien este tipo de cromosomas ha recibido diferentes denominaciones, como “cromosomas holocéntricos”, o “con centrómero o cinetocoro difuso”, o “no localizado”, el término más apropiado sería el de cromosomas holocinéticos (Bauer 1952, Sybenga 1972), dado que implica que la actividad cinética se encuentra distribuida en toda la longitud del cromosoma y no limitada a una región discreta como ocurre en los cromosomas monocinéticos o monocéntricos.

Los cromosomas holocinéticos se han descripto en una variedad de grupos no relacionados, como en unos pocos grupos de plantas monocotiledóneas (Grant 1989) y de invertebrados (White 1973). En el reino vegetal se pueden mencionar los géneros *Luzula* y *Juncus* (Juncaceae) (Malheiros-Gardé & Gardé 1951, Nordenskiöld 1951, Löve et al. 1957, Nordenskiöld 1962), siendo el primero de ellos uno de los más estudiados; también se han descripto en los géneros *Carex*, *Eleocharis*, *Rhynchospora*, *Cyperus* y *Scirpus* (Cyperaceae) (Löve et al. 1957, Strandhede 1965, Luceño et al. 1998, Dopchiz et al. 2000) y en dos especies del género *Chionographis* (Liliaceae) (Tanaka & Tanaka 1980). En el reino animal, y en particular entre los insectos, los cromosomas holocinéticos son característicos de Heteroptera, Homoptera, Lepidoptera,

Trichoptera (Wolf et al. 1997) y Odonata (Hughes-Schrader 1942, Halkka 1959, Murakami & Imai 1974, Kiauta 1975, Ueshima 1979); además, se encuentran en las pocas especies estudiadas de Phthiraptera (Bayreuther 1955, Scholl 1955) y Psocoptera (Mesa et al. 1991, Tombesi et al. 1999, Golub & Nokkala 2001). Los escasos estudios realizados en el orden Dermaptera, al igual que en unas pocas especies de la clase Chilopoda, parecen indicar que estos taxa también poseen cromosomas holocinéticos (Ogawa 1954, Suomalainen 1966, Ortiz 1969). Dentro de la clase Arachnida, el orden Acari (Keyl 1957, Pijnacker & Ferwerda 1972, Helle & Wysoki 1983), la familia Buthidae del orden Scorpionida (Shanahan 1989) y las especies analizadas hasta el presente de Dysderidae y Segestriidae del orden Araneae también presentan este tipo de cromosomas (Benavente 1982, Rodríguez Gil et al. 2002). Por último, todos los nematodos poseen también cromosomas holocinéticos, siendo los géneros *Parascaris*, *Ascaris* y *Caenorhabditis* los más estudiados (Albertson & Thompson 1982, Goday et al. 1985, Pimpinelli & Goday 1989).

A mediados del siglo XX, aún existía controversia con respecto al tipo de cromosomas que poseen los representantes de Heteroptera. Mendes (1949) y Parshad (1957a) sostenían que estos cromosomas eran monocéntricos debido a que observaban una conspicua constricción subterminal en metafase mitótica y, por ende, una supuesta constricción primaria. Por otro lado, Piza (1953) sostenía que los cromosomas de Heteroptera eran dicéntricos, basándose en sus observaciones de una restricción de la actividad cinética a cada extremo cromosómico durante la meiosis.

Hughes-Schrader y Schrader (1941, 1947, 1948, 1953, 1961) propusieron la existencia de un cinetocoro difuso o de una actividad cinetocórica difusa, debido a que la unión de las fibras del huso ocurría a lo largo de toda la superficie del cromosoma. Con el fin de demostrar su hipótesis, Hughes-Schrader y Schrader (1961) irradiaron ninfas y adultos de tres especies de Pentatomidae, *Euschistus servus*, *E. tristigmus* y *Solubea pugnax* (Schrader 1940, Hughes-Schrader & Schrader 1956, 1957). Estos autores observaron que los fragmentos cromosómicos resultantes del efecto deletéreo de las radiaciones ionizantes, en general presentaban un comportamiento normal durante las mitosis, y una aparente capacidad de perpetuarse a lo largo de varias generaciones celulares. En contraste, el comportamiento durante la meiosis no era tan regular debido a la ocurrencia de alteraciones estructurales como consecuencia propia de la irradiación, principalmente deleciones y translocaciones, y de la formación de multivalentes detectados en diacinesis, que daban como resultado la observación de aglutinamiento y movimiento rezagado de los cromosomas, así como la formación de puentes en anafase I. A pesar de estas irregularidades meióticas, muy raramente observaron la eliminación completa de un cromosoma o un fragmento por falla en su incorporación en uno de los núcleos telofásicos. Cuando sólo se



fragmentaba el cromosoma X, el comportamiento meiótico era totalmente normal, y en cuanto a los fragmentos de cromosomas autosómicos, la orientación y la unión de las fibras del huso también eran normales. Finalmente, concluyeron que los fragmentos libres provenientes tanto de la ruptura de los cromosomas sexuales como de los autosomas en los Heteroptera podían perpetuarse durante la mitosis y la meiosis (Hughes-Schrader & Schrader 1961). A partir de estas observaciones, Hughes-Schrader (1948) postuló una serie de características para distinguir claramente los cromosomas holocinéticos de los cromosomas monocéntricos:

- (1) cada cromosoma se orienta con su eje longitudinal en ángulo recto con respecto al eje polar en la metafase mitótica;
- (2) ninguna constricción primaria está presente durante la mitosis;
- (3) las fibras del huso se disponen a lo largo de cada cromátide y, por ello, las cromátides se separan por disyunción paralela en anafase mitótica;
- (4) la terminalización de los quiasmas se completa hacia diacinesis tardía.

Con posterioridad, estas características y la naturaleza holocinética de los cromosomas en Heteroptera fueron corroboradas por numerosos investigadores (Heizer 1950, Halkka 1956, Lewis & Scudder 1958, Wolfe & John 1965, Ueshima 1966a, b, La Chance et al. 1970).

A nivel ultraestructural Buck (1967), trabajando con *Rhodnius prolixus* (Reduviidae), observó una extensa capa de material electrodensito sobre los cromosomas mitóticos, a la cual se unían las fibras del huso, e interpretó a dicha estructura como el cinetocoro de los cromosomas holocinéticos. Sin embargo, esta capa de material electrodensito no se observaba en los cromosomas meióticos. Asimismo, Comings y Okada (1972) observaron en *Oncopeltus fasciatus* (Lygaeidae) que tal estructura se extendía hasta 75% de la longitud total de los cromosomas mitóticos, pero nuevamente no se observaba en meiosis. Por su parte, Ruthman y Permantier (1973) encontraron que en *Dysdercus intermedius* (Pyrrhocoridae) esta estructura cubría únicamente 4,2% del total de un cromosoma en mitosis y por sus dimensiones recordaba los cinetocoros de los cromosomas con centrómero localizado. Más recientemente, Motzko y Ruthmann (1984) realizaron un estudio ultraestructural más detallado de la arquitectura del huso en *Dysdercus intermedius*. De acuerdo con estos autores, en la metafase mitótica la superficie polar de los cromosomas presenta pequeños cinetocoros trilaminares. Dado que los extremos cromosómicos se conectan unos con otros en la prometafase, todo el conjunto de cromosomas se ubica en el plano de la placa metafásica y las placas hijas se separan paralelas entre sí en anafase, como si se tratara de grandes “cromosomas compuestos policéntricos” (Motzko & Ruthmann 1984).



Por un lado, los resultados obtenidos por algunos investigadores no parecen concordar plenamente y, por otro lado, han aparecido muy pocos trabajos que intentan analizar las características de estos cromosomas a nivel ultraestructural (Buck 1967, Comings 1972, Ruthmann & Permantier 1973, Solari 1979, Motzko & Ruthmann 1984, Solari & Agopian 1987).

## **2.2. Comportamiento mitótico de los cromosomas holocinéticos**

Los cromosomas mitóticos de células somáticas han sido raramente estudiados en Heteroptera, excepto en algunas células embrionarias (Hoy 1914, Papeschi 1992). Los cromosomas metafásicos mitóticos no muestran tendencia a adoptar una configuración de tipo radial o algún otro tipo de disposición en el plano ecuatorial, en contraste con las metafases meióticas de la mayoría de las familias de Heteroptera (White 1973, Manna 1984). En algunos casos los cromosomas mayores, cuando existen, pueden ocupar el centro de la placa metafásica rodeados por los cromosomas de menor tamaño (White 1973). El hecho de que los cromosomas holocinéticos presenten actividad cinética distribuida en toda su longitud determina que en la metafase mitótica se ubiquen en el plano ecuatorial con su eje mayor perpendicular al huso mitótico y que en anafase migren las cromátides en forma paralela entre sí y perpendiculares al eje del huso. Si bien estas características morfológicas y de comportamiento mitótico se han observado en todos los organismos con cromosomas holocinéticos, en muchos casos no resultan evidentes debido a que este tipo de cromosomas son generalmente muy pequeños e incluso a veces isodiamétricos (Papeschi 1992).

## **2.3. Orientación de los cromosomas meióticos**

Con respecto a la orientación de los cromosomas meióticos, los términos división reduccional y división ecuacional se aplicaron para distinguir a las dos divisiones meióticas y se refieren a la separación de segmentos homólogos de cromátides no hermanas o de segmentos hermanos de las cromátides durante anafase, respectivamente. De acuerdo al orden en el que acontecen estas divisiones, se denomina meiosis pre-reduccional cuando la reducción ocurre en la primera división meiótica y meiosis post-reduccional cuando sucede en la segunda división meiótica (Battaglia & Boyes 1955).

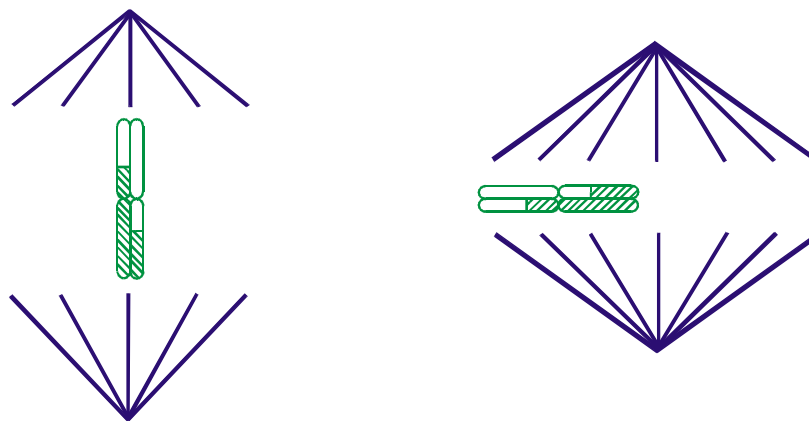
Sin embargo, teniendo en cuenta lo sugerido por Ris (1942), los términos pre-reducción y post-reducción de los cromosomas pierden su significado cuando ocurre entrecruzamiento, excepto en los organismos con cinetocoros localizados donde aún se pueden mencionar pre-reducción y post-reducción del cinetocoro. Por tal motivo, en los organismos con cromosomas holocinéticos, dado que no existen centrómeros de referencia, debe buscarse otro criterio para describir el comportamiento de los bivalentes en las dos divisiones meióticas (Ris 1942).

Battaglia y Boyes (1955) sugirieron que la distinción entre los términos pre-reducción y post-reducción tiene un significado general y un valor real. Después del apareamiento cromosómico durante la meiosis pueden ocurrir uno u otro de los siguientes acontecimientos:

- (1) la *disyunción de cromosomas homólogos*, usando el plano de apareamiento como el plano de división;
- (2) la *división de cromátides hermanas*, utilizando el plano de replicación entre ellas como plano de separación.

Según el orden en que ocurran estos procesos, la meiosis es pre-reduccional si la disyunción de los cromosomas homólogos acontece en la primera división meiótica y la división de las cromátides hermanas en la segunda; mientras que la meiosis es post-reduccional, si la división de las cromátides hermanas se produce en la primera y la disyunción de los cromosomas homólogos en la segunda división meiótica (Battaglia & Boyes 1955). Hasta el presente, los casos de meiosis post-reduccional en organismos con cromosomas holocinéticos han sido descriptos en Homoptera (Coccidae, Aphididae) (Ris 1942, Hughes-Schrader 1948, Helenius 1952), en el orden Odonata (Oksala 1943, 1944, 1945, 1948, 1952, Mola 1995) y en el orden Lepidoptera (Suomalainen 1953). Dentro del reino vegetal, este tipo de meiosis ha sido descripto en los géneros *Luzula* (Juncaceae) (Malheiros et al. 1947) y *Carex* (Cyperaceae) (Wahl 1940, Battaglia & Boyes 1955).

Desde un punto de vista citológico, existe una diferencia entre la primera división meiótica en la cual las dos cromátides del mismo lado del plano de formación del quiasma se dirigen hacia el mismo polo, y la primera división en la cual dichas cromátides se dirigen hacia polos opuestos. En el primer caso, los bivalentes se orientan axialmente con respecto al huso, i.e., con su eje mayor paralelo al eje polar, correspondiendo a una meiosis pre-reduccional; mientras que en el segundo caso, los bivalentes se orientan ecuatorialmente, i.e., con su eje mayor perpendicular al huso, siendo una meiosis post-reduccional (White 1973) (Figura 1).



**Figura 1.** Formas de orientación de un bivalente con un quiasma en metafase I en organismos con cromosomas holocinéticos

Por su parte, Darlington (1937) propuso los términos co-orientación y auto-orientación para definir la orientación de los bivalentes, que serían equivalentes a los términos orientación axial y ecuatorial, respectivamente (White 1973). La terminología propuesta por Darlington fue definida respecto al comportamiento de los centrómeros en los cromosomas con centrómeros discretos, no siendo posible extender su aplicación a los cromosomas holocinéticos (White 1973).

De acuerdo con White (1973), cuando los bivalentes holocinéticos se orientan axialmente y presentan una completa terminalización de los quiasmas en metafase I, desaparecen las conexiones terminales entre los telómeros durante anafase I; pero cuando se orientan ecuatorialmente desaparece la asociación entre las cromátides hermanas en anafase I. Esta distinción entre los dos tipos posibles de orientación de los bivalentes parece teóricamente clara. Mas en la práctica, especialmente con los cromosomas metafásicos pequeños y fuertemente condensados que son frecuentes en estos grupos de insectos, se encontraron grandes dificultades para determinar con exactitud el tipo de orientación que presentan (Ueshima 1963a, White 1973).

En Heteroptera la orientación axial parece ser la regla en la espermatogénesis, pero según Helenius (1952) y Halkka (1956) en la oogénesis de algunas especies de Lygaeidae acontecería, aparentemente, una orientación ecuatorial. A partir del estudio de la meiosis de la progenie híbrida entre hembras de *Cimex antennatus* ( $2n=24=22+XX$ ) y machos de *C. incassatus* ( $2n=22=20+XY$ ) y otros cruzamientos del complejo *C. pilosellus* (Cimicidae), Ueshima (1963a) ha brindado una evidencia clara sobre la orientación axial de los bivalentes en la espermatogénesis de Heteroptera. En la meiosis de la progenie híbrida observó la formación de nueve bivalentes, un trivalente y los univalentes sexuales X e Y. Además, ocho de los nueve bivalentes eran heteromórficos y cada uno estaba formado por dos cromátides pequeñas situadas a un lado del quiasma y dos grandes situadas al otro lado; el trivalente estaba formado por un cromosoma largo

y dos cortos, lo cual era indicio de que los cromosomas provenían de especies cromosómicamente diferentes. En metafase I la disposición de los bivalentes heteromórficos era siempre con sus dos cromátides pequeñas dirigidas a uno de los polos y las dos cromátides grandes dirigidas hacia el otro, y en anafase I acontecía una división reduccional, migrando las dos cromátides pequeñas a un polo y las dos grandes al otro. Con respecto al trivalente, en metafase I dos de sus seis cromátides migraban invariablemente hacia uno de los polos y cuatro hacia el otro, y en anafase I siempre el cromosoma largo migraba hacia un polo y los dos cromosomas cortos hacia el otro. Como resultado de la primera división, en metafase II nunca se observó la presencia de autosomas heteromórficos (cromosomas compuestos por dos cromátides de distinto tamaño) (Ueshima 1963b, 1979). En el caso de que una orientación ecuatorial hubiese tenido lugar en la primera división, se habrían observado en metafase II autosomas heteromórficos y un cromosoma compuesto por una cromátide grande y dos pequeñas. De manera análoga, en un mutante espontáneo de *Belostoma plebejum* (Belostomatidae) heterocigota para una fusión autosómica, se observó la formación de un trivalente en la primera división meiótica que segregaba reduccionalmente en anafase I. Se distinguían dos tipos de células en metafase II: con un cromosoma grande, o con dos pequeños (Papeschi 1994). El comportamiento de los trivalentes, así como el de los bivalentes heteromórficos, constituye una prueba irrefutable de la división reduccional de los autosomas de los Heteroptera en la primera división meiótica masculina (Ueshima 1963b, 1979, Papeschi 1994).

#### 2.4. Comportamiento meiótico de los autosomas

En Heteroptera se ha observado durante la meiosis una restricción de la actividad cinética a una de las regiones teloméricas, tanto en los autosomas como en los cromosomas sexuales, comportándose como si fueran cromosomas telocéntricos (cromosomas telocinéticos) (Hughes-Schrader & Schrader 1961, Motzko & Ruthmann 1984, González-García et al. 1996, Pérez et al. 1997, Suja et al. 2000).

El comportamiento telocinético de los cromosomas durante la meiosis se ha analizado con microscopio electrónico, y se ha propuesto una relación entre la arquitectura del huso y la organización cinética de dichos cromosomas (Motzko & Ruthmann 1984). Estos estudios han revelado que tanto los bivalentes autosómicos como los cromosomas sexuales están rodeados por vesículas membranosas laminares, formadas en diacinesis tardía y procedentes de la envoltura nuclear y del retículo endoplasmático liso (Motzko & Ruthmann 1984). Además, los cromosomas

están conectados a través de laminillas membranosas que se extienden hacia los polos y los microtúbulos del huso penetran por sus extremos libres. Por tal motivo, Motzko y Ruthmann (1984) han sugerido que las vesículas membranosas que los rodean actuarían restringiendo las regiones de unión de los microtúbulos del huso a los extremos teloméricos de los cromosomas en la meiosis. Las notables diferencias entre la arquitectura del huso en mitosis y en meiosis podrían estar correlacionadas con un cambio en la organización cinética de los cromosomas desde una distribución a lo largo de todo el cromosoma (holocinética) hasta su restricción a las regiones teloméricas (telocinética) (Motzko & Ruthmann 1984). Asimismo, estos autores han sugerido que esta cubierta membranosa que rodea a los cromosomas holocinéticos sería esencial para su orientación y correcta disyunción en ausencia de verdaderas placas cinetocóricas durante la meiosis (Motzko & Ruthmann 1984). Sin embargo, también se puede postular que la presencia de estas membranas es una adquisición secundaria, y que la restricción de la actividad cinética a las regiones teloméricas durante la meiosis es una propiedad inherente de los cromosomas determinada genéticamente.

En estudios citogenéticos realizados en *Myrmus miriformis* (Corizidae) y gracias a la presencia de un satélite terminal en el bivalente autosómico mayor, Nokkala (1985a) demostró que ambas regiones teloméricas de un cromosoma meiótico son potencialmente activas en cuanto a la función cinética durante la meiosis. Este autor sugiere que en los bivalentes autosómicos la actividad cinética de uno de los telómeros es suprimida por la formación del quiasma (Nokkala 1985a). Además, sus observaciones revelan que un par de regiones teloméricas es cinéticamente activo en la primera división meiótica y el otro par lo es en la segunda. Otros autores han corroborado posteriormente la hipótesis planteada por Nokkala (Nokkala 1985a, González-García et al. 1996, Pérez et al. 1997, Jacobs & Liebenberg 2001). En *Nezara viridula* (Pentatomidae) se observó que la formación de un quiasma excluía la actividad cinética de la zona en la cual ocurría su formación (Camacho et al. 1985). Sin embargo, se ha sugerido que existirían otros factores que influirían en la elección del extremo cromosómico cinéticamente activo, en la orientación y en la segregación de los cromosomas holocinéticos durante la meiosis (Pérez et al. 2000). La presencia de grandes bloques heterocromáticos podría producir una transferencia de la actividad cinética hacia el extremo eucromático opuesto. Este efecto puede producirse de manera directa, i.e., la heterocromatina sería menos apropiada para la actividad cinética, o indirectamente, lo sería a través del efecto del bloque heterocromático sobre otros factores, como por ejemplo la posición del quiasma (Pérez et al. 2000).

Sobre la base del conocimiento acerca del comportamiento mitótico y meiótico de los cromosomas holocinéticos, Nokkala (1985a) ha sugerido que las diferencias en la organización

entre los cromosomas mitóticos y meióticos podrían atribuirse a diferencias en la organización estructural del “sistema axial” de los cromosomas. Según este autor (1985a), es posible comprender el cambio en la actividad de los cromosomas de células mitóticas y meióticas si aquellas secuencias de ADN responsables de la actividad cinética estuvieran uniformemente distribuidas a lo largo del “sistema axial” del cromosoma, y dichas secuencias de ADN serían capaces de participar en la organización del cinetocoro en los cromosomas mitóticos. Sin embargo, el “sistema axial” de los cromosomas meióticos presentaría otra organización espacial, de tal manera que las secuencias de ADN con actividad cinética y distribución intersticial quedarían ocultas en el interior de las cromátides, lo que permitiría únicamente la actividad de aquellas secuencias situadas en las regiones teloméricas, donde el sistema axial alcance la superficie de la cromátide (Nokkala 1985a).

Más recientemente varios investigadores han incursionado en la caracterización de la actividad cinética difusa, en particular en el nematode *Caenorhabditis elegans* (Dernburg 2001, Henikoff et al. 2001, Howe et al. 2001, Moore & Roth 2001). Se han descripto una serie de proteínas específicas que se encuentran sólo en la región “centromérica”, entre las que se pueden mencionar la HCP-3 (holocentric protein 3), HCP-4, HCP-1, BUB-1, MCAK y HIM-10 y que estarían relacionadas con el comportamiento mitótico y meiótico de estos cromosomas. La proteína HCP-3 es homóloga de la proteína CENP-A de mamíferos y presenta una secuencia similar a la histona H3 en su dominio central conservado, difiriendo en la región amino-terminal. Esta proteína se detecta como múltiples focos discretos en los núcleos interfásicos, y luego, concomitantemente con la condensación cromosómica, éstos forman una banda a lo largo de los cromosomas mitóticos sobre la superficie polar de cada par de cromátides hermanas. Luego hay un proceso secuencial de ensamblaje jerárquico en el que participan las proteínas HCP-4, HCP-1, BUB-1 y MCAK. Nada se sabe respecto de los sitios de unión de HCP-3, pero no todas las secuencias genómicas están asociadas con estas proteínas. La proteína HCP-4 (similar a la proteína CENP-C de mamíferos) a su vez es necesaria para la resolución de las cromátides hermanas y la unión de las fibras del huso (Moore & Roth 2001).

Los resultados obtenidos sugieren un modelo en el que la condensación cromosómica es necesaria para reunir a la cromatina que contiene a HCP-3 en una estructura cromatínica de alto orden, que a su vez se requiere para el reclutamiento de HCP-4 en la región “centromérica”. Finalmente, la proteína HIM-10 sería esencial para la segregación cromosómica durante la mitosis y también la meiosis. Los estudios de Howe y colaboradores (Howe et al. 2001) muestran que HIM-10 contribuye a la actividad cinética durante la meiosis, de manera tal que los autores concluyen que las interacciones de los cromosomas con los microtúbulos en organismos con

cromosomas holocinéticos, tienen similitudes estructurales y funcionales con aquellos presentes en la mitosis.

## 2.5. Sistemas cromosómicos de determinación del sexo

Dentro de un sistema de determinación genética del sexo puede haber situaciones en las que los genes responsables no están situados en cromosomas especialmente diferenciados en relación con tal función, mientras que en otros casos se ha producido la aparición de cromosomas sexuales en el proceso evolutivo de los grupos taxonómicos (Lacadena 1996). Sin embargo, la diferenciación de los cromosomas sexuales no está correlacionada estrictamente con la evolución, en el sentido de que un organismo más evolucionado que otro puede no tener cromosomas sexuales y éste sí. Por ejemplo, algunos vertebrados inferiores no tienen cromosomas sexuales detectables citológicamente y los insectos sí (Lacadena 1996).

Hasta el presente, se han descripto varios sistemas cromosómicos de determinación del sexo dentro de Heteroptera. La mayoría de las especies de heterópteros se caracteriza por poseer el sistema simple de determinación sexual XY/XX (macho/hembra, respectivamente) (74,7% de las especies), mientras que el sistema X0/XX (14,8%) fue encontrado en algunas familias de heterópteros terrestres, tales como Coreidae y Alydidae, y en familias de heterópteros acuáticos, como Belostomatidae y Corixidae (Ueshima 1979). En este último sistema de determinación se distinguen dos categorías: una de ellas incluye al sistema cromosómico de determinación del sexo X0/XX presente en las familias del infraorden Gerromorpha, consideradas como uno de los más primitivos de Heteroptera (Ueshima 1979), mientras que la segunda categoría incluye a los sistemas sexuales X0/XX que habrían surgido secundariamente a partir del sistema sexual XY/XX por pérdida del cromosoma Y. Esta segunda categoría ha sido descripta en unos pocos géneros de la familia Lygaeidae y en el complejo Coreoidea-Pyrrhocoroidea (infraorden Pentatomorpha), al igual que en *Ectrychotes dispar* (Reduviidae), *Phylus melanocephalus* y *Plagiognathus* sp. (Miridae) (infraorden Cimicomorpha) (Ueshima 1979).

Además de los sistemas simples, se han descripto diversos sistemas múltiples de determinación del sexo para Heteroptera, algunos originados por fragmentación del cromosoma X ( $X_n0/X_nX_n$ ,  $X_nY/X_nX_n$ ) y otros, aunque con menor frecuencia, del cromosoma Y ( $XY_n/XX$ ) (10,3%) (Ueshima 1979, Manna 1984).

Aunque la presencia del sistema sexual neoXY es una característica muy común entre los insectos, en Heteroptera ha sido mencionado únicamente en tres especies: *Lethocerus* sp



(Chickering & Bacorn 1933) y *Lethocerus indicus* (Belostomatidae) (Jande 1959) y en *Rhytidolomia senilis* (Pentatomidae) (Schrader 1940).

## 2.6. Comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales

Los cromosomas sexuales de Heteroptera presentan un comportamiento meiótico diferente del de los autosomas (Ueshima 1979, Suja et al. 2000). En contraste con los bivalentes autosómicos de la gran mayoría de las especies, los cromosomas sexuales son asinápticos y aquiasmáticos y se comportan como univalentes durante la primera división meiótica masculina, independientemente del sistema cromosómico de determinación del sexo del que se trate (Suja et al. 2000).

Durante la profase meiótica masculina de Heteroptera los cromosomas sexuales se encuentran separados y son heteropicnóticos positivos. En algunas especies el apareamiento cromosómico tiene lugar en un tipo particular de cigotene, denominado sinicesis, en el que los cromosomas se compactan fuertemente. Después de paquitene, sigue un estadio difuso durante el cual los bivalentes autosómicos se descondensan en mayor o menor grado, presentando el núcleo un aspecto interfásico. En este estadio los cromosomas sexuales tienden a estar asociados o juntos de manera no quiasmática. En diacinesis están nuevamente separados y se tornan isopicnóticos. En metafase I los cromosomas sexuales se orientan lado a lado, ubicándose en el centro del anillo formado por los autosomas, y se comportan como univalentes (Ueshima 1979). En la gran mayoría de las especies estos cromosomas separan sus cromátides en anafase I, es decir, se dividen ecuacionalmente (Ueshima 1979, Suja et al. 2000). La segunda división meiótica se produce inmediatamente después de la telofase I, sin un período de intercinesis. En metafase II se asocian mediante un tipo de apareamiento denominado "touch-and-go" (Wilson 1925), i.e., asociación no quiasmática termino-terminal entre los cromosomas sexuales, formando un pseudobivalente (pII) y se sitúan en el centro del anillo formado por los autosomas (Ueshima 1979). Los cromosomas sexuales presentan una meiosis de tipo post-reduccional, i.e., se dividen ecuacionalmente en la primera división meiótica y reduccionalmente en la segunda división (Ueshima 1979).

Sin embargo, se han observado diferencias significativas en el comportamiento de los cromosomas sexuales en todas las especies de la familia Tingidae estudiadas citogenéticamente hasta el presente (Montgomery 1906, Jande 1960, Ueshima 1979). Los cromosomas sexuales X e Y forman un pseudobivalente en metafase I y presentan una meiosis de tipo pre-reduccional, es



decir, se dividen reduccionalmente en la primera división meiótica y ecuacionalmente en la segunda división (Ueshima 1979). Este tipo de división ha sido descripto también para los cromosomas sexuales de los géneros *Archimerus* (Wilson 1905b, 1909a, 1932, Morrill 1910) y *Pachylis* (Wilson 1909a, 1911, Schrader 1932, Piza 1946d) de Coreidae, en el género *Anisops* de Notonectidae (Jande 1961) y en *Ectrychotes dispar* de Reduviidae (Manna 1951).

Los resultados obtenidos con microscopio electrónico por Ruthmann y Permantier (1973) en *Dysdercus intermedius* (Pyrrhocoridae) (X0/XX), por Solari (1979) en *Triatoma infestans* (Reduviidae) (XY/XX) y por Suja y colaboradores (2000) en *Graphosoma italicum* (Pentatomidae) (XY/XX), *Pyrrhocoris apterus* (Pyrrhocoridae) (X0/XX) y *Coreus marginatus* (Coreidae) (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>0/X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>), son coincidentes en cuanto a la ausencia de elemento axial y de complejo sinaptonémico en los cromosomas sexuales, y a la presencia de complejos sinaptonémicos en todos los bivalentes autosómicos. Por un lado, Solari (1979) propuso que la ausencia de elementos axiales y de complejo sinaptonémico en los cromosomas sexuales X e Y estaría relacionada con la segregación de sus cromátides en anafase I, es decir, con su división ecuacional en la meiosis I. Según Suja y colaboradores (2000), la ausencia de elementos axiales en los cromosomas sexuales es indicio de que estos no son directamente responsables de la cohesión de las cromátides hermanas durante la meiosis. Además, sugirieron que las especies de heterópteros con sistemas XY, X<sub>n</sub>Y y XY<sub>n</sub> habrían desarrollado un tipo específico de asociación aquiasmática para asegurar una correcta segregación de estos cromosomas a las gametas.

## 2.7. Cromosomas *m*

El término cromosomas *m* fue introducido por primera vez por Wilson (1905a) en su estudio sobre la familia Coreidae, al describir un par de elementos diminutos que se comportaban de una manera diferente de la de los autosomas y los cromosomas sexuales durante la meiosis. En algunos casos se ha observado que el tamaño de estos cromosomas *m* es similar al de los autosomas, siendo su comportamiento y no su tamaño lo que los caracteriza.

Dentro de Heteroptera la presencia de cromosomas *m* ha sido mencionada en especies de las familias Corixidae, Naucoridae, Notonectidae y Pleidae (infraorden Nepomorpha), en especies de Saldidae (infraorden Leptopodomorpha), y en especies de Colobathristidae, Lygaeidae, Largidae, Stenocephalidae, Hyocephalidae, Coreidae, Alydidae y Rhopalidae (infraorden Pentatomomorpha) (Ueshima 1979).

Los cromosomas *m* permanecen siempre desapareados durante la profase meiótica temprana y son aquiasmáticos. En diacinesis tardía se aproximan y se asocian, y durante metafase I se co-orientan formando un pseudobivalente. Asimismo, son ligeramente heteropicnóticos negativos en metafase I, persistiendo con esta picnosis hasta finalizar la meiosis. Los cromosomas *m* migran precozmente hacia los polos en anafase I; en metafase II el cromosoma *m* se ubica usualmente en el centro del huso (Ueshima 1979). Si bien el comportamiento meiótico precedentemente descrito es el típico para los cromosomas *m*, se observaron modificaciones menores entre los distintos taxa, particularmente en relación con el inicio de la heteropicnosis negativa y la disposición que adoptan en ambas placas metafásicas (Ueshima 1979). La secuencia meiótica de estos cromosomas aquiasmáticos involucra una división reduccional en la primera división meiótica y ecuacional en la segunda división (Ueshima 1979).

En la meiosis masculina de los Heteroptera en general, la disposición de los distintos tipos cromosómicos en las placas metafásicas no es al azar, sino que existe un arreglo particular. La arquitectura de la placa metafásica más común está compuesta por los autosomas dispuestos formando un anillo y en su interior se ubican los cromosomas sexuales. Sin embargo, se han observado derivaciones a partir de esta típica configuración, dependiendo del sistema cromosómico de determinación del sexo en cuestión y de la presencia/ausencia de cromosomas *m* (Ueshima 1979).

En general, cuando están presentes los cromosomas *m*, los cromosomas X e Y se disponen en la periferia de la placa en metafase I, mientras que en metafase II el pseudobivalente XY y el cromosoma *m* se ubican en el centro del anillo formado por los autosomas (Ueshima 1979). Esta disposición ha sido descrita en Stenocephalidae (Lewis & Scudder 1958), en Corixidae (Peters & Kleba 1971) y en Lygaeidae (Ueshima & Ashlock 1980). En otros casos, como en *Rhyppodes clavicornis* y muchas otras especies de Lygaeidae, puede ocurrir que tanto los cromosomas sexuales X e Y como los *m* se localicen en el centro del anillo formado por los autosomas en metafase I, mientras que en metafase II el cromosoma *m* forma parte del anillo de autosomas y el pseudobivalente sexual se ubica en su centro (Ueshima 1979). Además, en *Pylorgus colon* (Lygaeidae) el cromosoma X forma parte del anillo y los cromosomas *m* junto con el Y se disponen en su centro en metafase I; en metafase II el pseudobivalente XY y el cromosoma *m* se localizan en el centro del anillo formado por los autosomas (Ueshima 1979, Ueshima & Ashlock 1980). Por último, otra variación de la típica disposición es la presente en *Antillocoris minutus* (Lygaeidae), donde los cromosomas X e Y se disponen en el centro del anillo formado por los autosomas y los cromosomas *m*, mientras que en metafase II el pseudobivalente XY junto con el *m* se sitúan en el centro del anillo de autosomas (Ueshima 1979).

Cabe destacar que el significado de la diversidad de disposiciones cromosómicas existentes en las placas metafásicas aún es desconocido, así como del posible mecanismo que las regula (Ueshima 1979).

## 2.8. Cromosomas supernumerarios

En adición a los cromosomas del complemento cromosómico básico de un organismo, pueden aparecer cromosomas extra denominados cromosomas supernumerarios o B. Estos cromosomas supernumerarios han sido observados en muchos animales y plantas (White 1973). La presencia de cromosomas supernumerarios ha sido citada en muy pocas especies de Heteroptera y, en general, se refieren a la aparición de uno o dos individuos portadores de dichos cromosomas en las muestras analizadas. Hasta el presente, la presencia de cromosomas B fue observada en *Acanthocephala femorata* (= *Metapodius*), *A. granulosa* y *A. terminalis* (Coreidae) (Wilson 1907a, 1910); *Cimex lectularius* y *Paracimex* sp. (Cimicidae) (Darlington 1939, Slack 1939, Ueshima 1963b, 1979); *Largus rufipennis* (Largidae) (Mola & Papeschi 1993); *Metochus unguittatus* (= *Dieuches*) y *Dieuches* sp. (Lygaeidae) (Manna 1951); *Nabis lineatus*, *N. rugosus*, *N. oricetorum* y *N. brevis* (Nabidae) (Mikolajski 1965, 1967); *Anisops niveus* (Notonectidae) (Jande 1961) y *Banasa calva* (Pentatomidae) (Wilson 1907b, Papeschi 1992). En general, el comportamiento meiótico de los cromosomas supernumerarios es similar en todos los casos, dividiéndose ecuacionalmente en anafase I y reduccionalmente en anafase II.

Una situación diferente fue descripta para las tres especies de *Acanthocephala* (= *Metapodius*) y *Cimex lectularius* (Cimicidae), en las que los cromosomas supernumerarios son aparentemente de origen sexual. En *Acanthocephala femorata*, *A. granulosa* y *A. terminalis* ( $2n = 18 + 2m + X_0$ , macho) Wilson (1907a, 1910) mencionó la presencia de uno a cinco cromosomas extra que en metafase II se asocian con el cromosoma X formando una cadena y segregan de éste en anafase II. Sobre la base de sus observaciones Wilson concluye que estos cromosomas supernumerarios “tipo Y” son genéticamente inertes, dado que varían en número y no tienen efectos fenotípicos aparentes. Por otro lado, *Cimex lectularius* ( $2n = 26 + X_1X_2Y$ , macho) presenta entre uno y trece cromosomas supernumerarios “tipo X”, que se disponen en metafase II junto con los sexuales  $X_1$  y  $X_2$  dirigidos al polo opuesto del cromosoma Y (disposición denominada en doble placa) y segregan regularmente de éste en anafase II (Darlington 1939, Slack 1939, Ueshima 1979). Asimismo, en *Cimex lectularius* los cromosomas supernumerarios no están sujetos a la reducción en el número en la meiosis masculina. Por consiguiente, se produce una acumulación de cromosomas

supernumerarios, explicándose de cierta forma el alto número de dichos cromosomas observados en poblaciones naturales de esta especie (Ueshima 1979).

Aunque los cromosomas B son transcripcionalmente inertes en relación con los altos niveles de transcripción de los cromosomas A, varias funciones genéticas importantes han sido asignadas a ellos (Appels et al. 1998). Los cromosomas B usualmente portan los genes funcionales de ARN ribosomal y los genes que afectan el apareamiento, la formación de quiasmas y la recombinación genética de los cromosomas A (Appels et al. 1998). Sin embargo, serían enteramente inertes desde el punto de vista genético en especies de Heteroptera, ya que no existe evidencia alguna de que estos cromosomas supernumerarios afecten su fenotipo (Ueshima 1979).

## 2.9. Comportamiento meiótico de univalentes autosómicos

En general, es aceptado que la formación de univalentes dentro de una especie puede tener varias causas, tanto genotípicas como ambientales aunque el/los mecanismo/s involucrados en su formación aún son desconocidos (Jones 1987).

Con respecto a las causas genotípicas, la presencia de univalentes autosómicos podría deberse a asinapsis, i.e., una falla en la formación primaria del complejo sinaptonémico en cigotene, o a desinapsis, i.e., una falla en la formación del quiasma luego de una sinapsis normal (Jones 1987). Sin embargo, generalmente es difícil establecer el origen asináptico o desináptico de los univalentes presentes en metafase I, debido a que los estadios de la profase meiótica temprana son difíciles de analizar en muchos organismos. En aquellos casos en donde dichos estadios son analizables, cuando ocurre un apareamiento parcial es extremadamente difícil distinguir si una región desapareada ha estado en esta condición a lo largo de la meiosis, o si luego de un apareamiento inicial ha sufrido una desinapsis (Riley & Law 1965).

Hasta el presente, la presencia de univalentes autosómicos en Heteroptera se ha descrito en *Myrmus miriformis* (Corizidae) (Nokkala 1985b), *Calocoris quadripunctatus* (Miridae) (Nokkala 1986), *Acanonicus habni* (Coreidae) (Papeschi & Mola 1990a) y *Largus rufipennis* (Largidae) (Mola & Papeschi 1993). Los univalentes autosómicos observados en *Myrmus miriformis* se orientan axialmente en metafase I y con ambas cromátides paralelas entre sí (Nokkala 1985b), mientras que una situación diferente fue descrita en *Calocoris quadripunctatus* (Miridae). En esta especie se observó que los univalentes autosómicos también se orientan axialmente en metafase I con ambas cromátides paralelas, pero dispuestas lado a lado o asociadas extremo a extremo (Nokkala 1986). En ambos casos los univalentes segregan regularmente en la primera división meiótica, se

dividen reduccionalmente, y en anafase I se rezagan con respecto al resto de los autosomas (Nokkala 1986). Tanto en *Myrmus miriformis* como en *Calocoris quadripunctatus* no fue mencionado el origen de los univalentes ni su frecuencia en las poblaciones estudiadas.

El análisis citogenético de poblaciones argentinas de *Acanonicus habni* (Papeschi & Mola 1990a) y de *Largus rufipennis* (Mola & Papeschi 1993) reveló la presencia de un par de univalentes autosómicos con una frecuencia variable. En metafase I el par de univalentes de ambas especies se dispone en el centro del anillo formado por los bivalentes autosómicos, y en anafase I se dividen ecuacionalmente. En metafase II los univalentes se asocian formando un pseudobivalente, el cual se ubica generalmente en el centro del anillo de autosomas, y en anafase II se divide reduccionalmente (Papeschi & Mola 1990a, Mola & Papeschi 1993).

## 2.10. Mecanismos de evolución del cariotipo en Heteroptera

El proceso evolutivo del cariotipo de una especie es usualmente estimulado por alteraciones estructurales en su genoma. La naturaleza de dichas alteraciones está determinada por la arquitectura de los cromosomas y su comportamiento; de manera tal que, por ejemplo, las inversiones son muy comunes en ciertos taxa, mientras que las translocaciones pueden ser favorecidas por la selección en otros grupos (Thomas 1987). Este principio fue denominado ortoselección cariotípica (White 1979). En Heteroptera en particular, raramente se han detectado heterocigotas estructurales para inversiones (Papeschi & Mola 1990b), mientras que la existencia de translocaciones recíprocas no ha sido descripta para ninguna de las aproximadamente 1.200 especies de heterópteros estudiadas citogenéticamente hasta el presente (Manna 1984).

Las características más importantes que gobiernan la evolución del cariotipo en Heteroptera son la naturaleza holocinética de sus cromosomas, la meiosis post-reduccional, el comportamiento asináptico de los cromosomas sexuales y un sistema estable de determinación sexual. Por otro lado, las variaciones intra e interespecíficas en el número de cromosomas sexuales son importantes en la variación cariotípica, especialmente en las familias Cimicidae y Coreidae (Thomas 1987).

En Heteroptera, al igual que en otros grupos de organismos, el término número modal se utiliza para referirse al número cromosómico diploide más frecuentemente encontrado en un determinado taxón. Este término es aplicado generalmente a categorías taxonómicas inferiores como tribu o género, aunque algunas veces puede ser utilizado al nivel de familia (Ueshima 1979). En torno al número modal, muchas veces se lo considera como el número atávico y otras veces

representa simplemente el número cromosómico característico de un subgrupo que es numéricamente dominante. Por tal motivo, es importante tener en cuenta que el número modal se basa en un grupo de especies, que podrían no ser una muestra representativa del taxón en estudio.

En Heteroptera la mayoría de los citogenetistas sostiene la idea de que las fusiones y las fragmentaciones son procesos factibles debido a la naturaleza holocinética de sus cromosomas y, por lo tanto, éstas se producen con mayor probabilidad y libres de ciertos impedimentos inherentes a los cromosomas monocéntricos (Manna 1984, Papeschi & Bidau 1985). Por lo tanto, el curso de la evolución cariotípica por fragmentación cromosómica podría ser explicado fácilmente en aquellos taxa que poseen cromosomas holocinéticos. Este mecanismo ha sido denominado agmatoploidía, definido por Malheiros-Gardé (Malheiros-Gardé & Gardé 1950) como el aumento del número de cromosomas por fragmentación cromosómica.

Basándose en la hipótesis de que el número de cromosomas holocinéticos pueda aumentar por agmatoploidía, se podría esperar una tendencia hacia números cromosómicos más altos en los taxa que poseen dichos cromosomas (Thomas 1987). Sin embargo, el número de cromosomas en Heteroptera es muy estable, caracterizándose la mayoría de sus familias por un número cromosómico diploide modal, por lo menos para los autosomas (Ueshima 1979). Por otro lado, Heizer (1950) y Hughes-Schrader y Schrader (1961) propusieron que en Heteroptera las fragmentaciones, deleciones y duplicaciones se fijarían más fácilmente en los cromosomas sexuales que en los autosomas (Thomas 1987).

Se ha sugerido también a la poliploidización autosómica como otro mecanismo involucrado en la evolución del cariotipo en Heteroptera, principalmente en aquellos casos en donde la diferencia en el número de cromosomas es exacta o aproximadamente múltiplo del número cromosómico atávico (Thomas 1987, 1996). Aunque el mecanismo de fragmentaciones consecutivas podría ser una explicación de estas diferencias en el número de cromosomas, de acuerdo con Thomas (1996) la poliploidización sería el proceso de especiación más aceptable para elucidar los grandes incrementos producidos en el número de autosomas de ciertos taxa en Heteroptera. Hasta el presente, sólo se han mencionado once casos potenciales de especiación por poliploidización en Heteroptera (Thomas 1996). Según este autor, si bien la poliploidización no ha sido el proceso fundamental de especiación en Heteroptera, su papel macroevolutivo debería ser tenido en cuenta (Thomas 1996).

Una de las cuestiones más interesantes respecto de la evolución del cariotipo en Heteroptera es el problema de la evolución de los sistemas cromosómicos de determinación del sexo, debido a que estos sistemas sexuales han sufrido cambios tanto en su constitución como en su comportamiento (Nokkala & Nokkala 1984, Grozeva & Nokkala 1996). En general, los

mecanismos que originan sus sistemas cromosómicos múltiples se caracterizan por no involucrar una disminución en el número de autosomas (Ueshima 1979). Aunque los detalles no son totalmente claros en todos los casos, la situación general es que la adquisición de cromosomas múltiples Xs o Ys no ha involucrado la pérdida de pares de autosomas y, por consiguiente, debe haber sucedido por algún tipo de fragmentación de los cromosomas sexuales originales (Ueshima 1979). En *Belostoma orbiculatum* (Belostomatidae) se ha descrito una población polimórfica para el sistema cromosómico de determinación del sexo, encontrándose ejemplares masculinos XY y  $X_1X_2Y$ . La comparación del tamaño cromosómico permitió corroborar el origen del sistema múltiple por fragmentación del cromosoma X del sistema original (Papeschi 1994).

Por razones aún desconocidas, los cromosomas sexuales X e Y muestran una tendencia diferencial a experimentar fragmentaciones (Nokkala & Nokkala 1996). En particular, la fragmentación del cromosoma X es más frecuente que la fragmentación del cromosoma Y (Ueshima 1979) y se ha sugerido que esta fragmentación se basa en la presencia de secuencias teloméricas en posiciones internas dentro del cromosoma X (Papeschi 1994). Si la fragmentación ocurre en las proximidades de dichas secuencias, los fragmentos resultantes estarían capacitados para volver funcionales a sus regiones teloméricas y, por lo tanto, asegurar el comportamiento regular de los nuevos cromosomas (Papeschi 1994). Por otro lado, la fragmentación del cromosoma Y parece ser un acontecimiento extremadamente raro, debido a que probablemente las secuencias teloméricas no estarían localizadas en posiciones intersticiales en este cromosoma sexual. Además, el cromosoma Y ha sido más propenso a experimentar su pérdida que fragmentaciones (Nokkala & Nokkala 1996).

Entre los insectos, los sistemas cromosómicos de determinación del sexo neoXY son sumamente frecuentes en los órdenes Orthoptera y Odonata (White 1973, Mola & Papeschi 1994), en la familia Psylloidea (Homoptera) (Kuznetsova et al. 1997) y en el suborden Auchenorrhyncha (Homoptera) (Emelyanov & Kirillova 1989, Kuznetsova 1989, Emelyanov & Kirillova 1991), los cuales se caracterizan por poseer predominantemente el sistema cromosómico de determinación del sexo  $X0/XX$  (Nokkala & Nokkala 1999). En Heteroptera el neo-sistema presente en *Lethocerus* sp (Chickering & Bacorn 1933) y *Lethocerus indicus* (Belostomatidae) (Jande 1959) y en *Rhytidolomia senilis* (Pentatomidae) (Schrader 1940), se habría originado a partir de la fusión de los cromosomas sexuales X e Y con un par autosómico, resultando un sistema cromosómico de determinación del sexo particular, denominado neoX-neoY (Nokkala & Nokkala 1999).



### 3. Antecedentes Moleculares y Citogenético-Moleculares en Heteroptera

El genoma de los organismos eucariotas superiores comprende diversos tipos de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN). Entre estos tipos de secuencias la variedad altamente repetida, principal componente de la heterocromatina constitutiva, es ampliamente utilizada como herramienta eficaz en estudios de biología evolutiva, y el análisis de su secuencia puede ser empleado en la reconstrucción de la filogenia del taxón en estudio (Brutlag 1980, Redi et al. 1986, Bogenberger et al. 1987, John 1988). El análisis comparativo entre el grado de amplificación o de homogeneidad de los bloques de las secuencias repetidas y su distribución en los cromosomas de una determinada especie, es usado para poner en evidencia las relaciones cariológicas existentes dentro de un taxón polimórfico (Hamilton et al. 1990, Garagna et al. 1993, Modi 1993).

Las enzimas de restricción o nucleasas tienen la propiedad de reconocer una secuencia específica de cuatro a ocho bases de nucleótidos de longitud, y producir un corte debido a su actividad hidrolítica en ambas cadenas de la doble hélice de la molécula de ADN, donde la secuencia esté presente. De esta manera, una enzima de restricción particular cortará al ADN nuclear en una serie de fragmentos específicos, denominados fragmentos de restricción. Las enzimas de restricción se clasifican en dos grupos: las exonucleasas que comienzan su actividad por los extremos de la cadena y las endonucleasas que pueden hidrolizar el interior de un polinucleótido en uno o varios lugares (Freifelder 1983, Lewin 1994). Las endonucleasas de restricción que reconocen secuencias cortas de cuatro nucleótidos se llaman enzimas de restricción de alta frecuencia de corte, mientras que las endonucleasas que reconocen secuencias de ocho nucleótidos se denominan enzimas de restricción de baja frecuencia de corte (Freifelder 1983, Lewin 1994).

Los tipos de cortes que producen las enzimas pueden ser protuberantes o cohesivos, en el cual ambos extremos poseen una cola de base complementaria y, por lo tanto, pueden volver a asociarse con cualquier otro extremo producido por la misma enzima o por otra nucleasa que produzca los mismos extremos cohesivos.

5'...GAATTC...3'  
3'...CTTAAG...5'

5'...G  AATTC...3'  
3'...CTTAA  G...5'

5'...G AATTC...3'  
3'...CTTAA G...5'

El otro tipo de corte es el romo, en el cual los extremos producidos no presentan colas o extremos cohesivos y la reasociación es muy difícil (Freifelder 1983, Lewin 1994).





La comparación de los tamaños de los fragmentos de restricción, producidos por diferentes enzimas de restricción para una determinada muestra de ADN, permite obtener un mapa de restricción de dicha región y, a su vez, mostrar la ubicación de cada corte para cada enzima en relación con los sitios vecinos, también denominada secuencia de restricción. Por consiguiente, un mapa de restricción refleja el ordenamiento específico de la secuencia de nucleótidos de la región del ADN en estudio; de esta manera, diferentes regiones de ADN de una especie, o muestras de ADN de diferentes taxones, pueden ser comparadas entre sí a través de los correspondientes mapas de restricción (Freifelder 1983, Lewin 1994). Asimismo, una vez aislados dichos fragmentos, se pueden utilizar como sondas o marcadores genéticos y es posible determinar su localización cromosómica mediante hibridaciones *in situ* sobre cromosomas (Pinkel et al. 1986, Larramendy et al. 1993, Knuutila et al. 1994). De este modo, la hibridación *in situ* constituye un punto de contacto entre la citogenética y las técnicas moleculares.

La técnica de hibridación *in situ* se basa fundamentalmente en dos aspectos: la desnaturalización del ADN y renaturalización (hibridación) con sondas específicas marcadas, y la identificación del cromosoma y la región cromosómica sobre la que se produce la hibridación. Asimismo, cualquier ADN o ARN puede ser usado como sonda, las cuales pueden clasificarse en cuatro tipos básicos:

- (1) aquellas que consisten de ADN genómico total de una especie, denominándose a la técnica Hibridación *In Situ* de ADN Genómico total (GISH);
- (2) aquellas que provienen de técnicas de ADN recombinante, como por ejemplo plásmidos que contienen un inserto o secuencia de ADN de interés para el estudio, denominadas sondas de ADN específico;
- (3) aquellas que provienen de amplificación *in vitro* de la secuencia de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cuales son también consideradas sondas de ADN específico en contraposición a las de ADN genómico total;
- (4) aquellas que fueron sintetizadas *in vitro* con un sintetizador de ADN, las cuales poseen 10 a 50 pb y permiten detectar genes específicos o secuencias de ADN repetidas (Popescu et al. 2000).

Hasta el presente, existe un número limitado de protocolos de extracción de ADN de alto peso molecular de insectos (Reineke et al. 1998). Además, se debe tener en cuenta que la calidad del ADN obtenido dependerá del protocolo de extracción utilizado y que el método de extracción de

ADN más apropiado dependerá de la fuente de ADN, debido a las diferencias en las sustancias presentes en el material biológico (Reineke et al. 1998). Al nivel de Heteroptera, los estudios moleculares representan un campo muy poco conocido para la ciencia mundial y más aun, en lo que respecta a la entomofauna Neotropical y a la de la Argentina.

#### 4. Generalidades de la familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae

El presente trabajo de Tesis se basa en el análisis citogenético y citogenético molecular de especies de las familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae procedentes de distintas localidades de la República Argentina.

##### 4.1. Características biológicas

La familia **Coreidae** comprende, por lo menos, 250 géneros y 1.800 especies, las cuales están ampliamente distribuidas en todo el mundo, presentando una mayor diversidad en las zonas tropicales y subtropicales (Schuh & Slater 1995). La mayoría de los coreidos poseen cuerpos muy robustos, usualmente de forma ovalada o elongada, cuyo tamaño varía entre 7 y 45 mm, y de colores predominantemente parduscos, ocasionalmente rojos o amarillos, o incluso verde metálico (Richards & Davies 1983a, Schuh & Slater 1995). Los segmentos antenales 2 y 3 están frecuentemente dilatados y aplanados, los hemiélitros poseen una venación múltiple en su membrana, la tibia y el fémur del tercer par de patas están ensanchados o dilatados con frecuencia, y todos los espiráculos abdominales son ventrales (Richards & Davies 1983a, Schuh & Slater 1995). Muchas especies están ornamentadas con espinas y tubérculos, particularmente en los ángulos humerales del pronoto. Los coreidos son todos fitófagos, se alimentan del sistema vascular de las plantas (Mitchell 1980) y la mayoría vive en las plantas por encima del suelo (Richards & Davies 1983a, Schuh & Slater 1995). Muchas especies de coreidos muestran una asociación definida con un grupo particular de plantas, mientras que otras se alimentan de diversas plantas no relacionadas (Schaefer & Mitchell 1983).

Si bien la familia **Largidae** ha sido tratada como una subfamilia de Pyrrhocoridae (Van Duzee 1916), la mayoría de los trabajos recientes han considerado a este taxón como una familia basándose en grandes diferencias en los genitales femeninos (Stys & Kerzhner 1975, Henry 1988,

Schuh & Slater 1995). Hasta el presente, se han descripto más de 100 especies pertenecientes a 15 géneros, distribuidas en la mayoría de las regiones zoogeográficas y alcanzando su mayor diversidad y abundancia en las zonas tropicales y subtropicales (Schuh & Slater 1995). Los miembros de esta familia son de tamaño moderadamente pequeño. El cuerpo es de forma ovoide, oblonga o alargada y frecuentemente de coloración brillante (Schuh & Slater 1995). Usualmente poseen antenas y patas relativamente cortas, los ocelos están ausentes, el primer par de alas presenta en su membrana una celda basal y una compleja venación, y frecuentemente los urosternitos están fusionados y obliterados (Schuh & Slater 1995). Todas las especies de esta familia son fitófagas y se alimentan de semillas y de los jugos de las plantas. Algunos géneros se caracterizan por vivir en el suelo, mientras que otros viven en los árboles y arbustos (Schuh & Slater 1995).

La familia **Lygaeidae** *sensu lato* fue reconocida por primera vez por Schilling (1829) y hasta el presente, se conocen 4.000 especies y 500 géneros, las cuales se hallan ampliamente distribuidas por todo el mundo (Schuh & Slater 1995). Esta familia comprende insectos de formas y tamaños variados (1,2-12 mm), siendo la mayoría de las especies de tamaño pequeño y de color pardo o negro, aunque muchas presentan coloración roja o amarilla y negra brillantes (Schuh & Slater 1995). Excepto las formas braquípteras, sus miembros poseen ocelos, las antenas insertas bien hacia abajo a los lados de la cabeza, con 4-5 venas en la membrana del primer par de alas, los espiráculos abdominales de posición extremadamente variada y muchos de sus miembros poseen órganos estridulatorios (Richards & Davies 1983a, Schuh & Slater 1995). Asimismo, muchas especies son mirmecomórficas, con una constricción en los segmentos anteriores y una expansión de los segmentos posteriores abdominales, al igual que protusiones cónicas similares a la de las hormigas, tanto en el pronoto como en el escutelo (Schuh & Slater 1995). La gran mayoría de las especies se alimentan de semillas maduras (Sweet 1964) y generalmente se encuentran en musgos, escombros de superficie, debajo de piedras o en plantas bajas (Richards & Davies 1983a, Schuh & Slater 1995). Sin embargo, hay una gran variedad de hábitos de alimentación, como la subfamilia Blissinae que se alimenta de la savia de las plantas, la mayoría de los Geocorinae que son predadores de pequeños artrópodos y las especies de la tribu Cleradini que se alimentan de la sangre de sus hospedadores vertebrados (Schuh & Slater 1995).

Los miembros de la familia **Pyrhcoridae** se hallan distribuidos principalmente en las zonas tropicales y subtropicales; no obstante, se los encuentra en casi todas las regiones zoogeográficas (Schuh & Slater 1995). Las Pyrrhocoridae son de tamaño mediano (8-30 mm) y a menudo presentan una coloración fuertemente contrastada roja y negra o amarilla y negra. Los ocelos están ausentes, en las membranas de los hemiélitros se observan dos celdas basales y una serie de 7-8 venas

anastomosadas distalmente, y los espiráculos abdominales son de posición ventral (Richards & Davies 1983a, Schuh & Slater 1995). La mayoría de estas chinches se alimenta de semillas y frutos, particularmente de Malvales. La mayoría de las especies conspicuas son de hábitos arbóreos, aunque en el Viejo Mundo hay un significativo número de especies que viven en el suelo y se alimentan de semillas maduras (Schuh & Slater 1995).

La familia **Rhopalidae** ha sido frecuentemente considerada como una subfamilia de Coreidae, pero en los trabajos de Chopra (1967) y Göllner-Scheiding (1983) ha sido considerada como una familia distinta (Schuh & Slater 1995). Las Rhopalidae se encuentran distribuidas en casi todas las regiones zoogeográficas, aunque la distribución de ciertos miembros es poco común, como por ejemplo, la tribu Niesthreini que comprende sólo tres géneros, dos de los cuales están en el Hemisferio Occidental y el tercero se halla en Africa del Sur e India (Schuh & Slater 1995). El cuerpo de los miembros de esta familia es de un tamaño variado desde 4 hasta 15 mm y presenta una gran variedad de formas y colores, siendo la mayoría de color pardo oscuro (Schuh & Slater 1995). En la cabeza se distinguen los ocelos situados en tubérculos bajos y las antenas poseen una constricción basal en el primer segmento; el *corium* del hemiélitro presenta grandes áreas hialinas o transparentes y numerosas venas en su membrana, y las aberturas metatorácicas de las glándulas repugnatorias están suprimidas o atrofiadas. Todas las especies de esta familia son fitófagas y se alimentan de diversas hierbas y plantas leñosas (Schuh & Slater 1995).

#### 4.2. Antecedentes citogenéticos

En las **Coreidae** el número cromosómico diploide más frecuente es 21 ( $18+2m+X_0$ ), variando entre 13 ( $10+2m+X_0$ ) y 28 ( $24+2m+X_1X_2$ ). El sistema cromosómico de determinación del sexo más frecuente es  $X_0/XX$ ; no obstante, en algunas especies se ha descrito la presencia del sistema  $X_1X_2/X_1X_1X_2X_2$  (Ueshima 1979). Asimismo, esta familia se caracteriza por la presencia de un par de cromosomas  $m$  (Ueshima 1979, Manna 1984).

Por lo general, los cromosomas sexuales de las especies de Coreidae presentan una meiosis de tipo post-reduccional; sin embargo, una meiosis de tipo pre-reduccional ha sido descrita en los géneros *Archimerus* y *Pachylis* (Wilson 1905b, 1909a, Morrill 1910, Wilson 1911, Schrader 1932).

En la familia **Largidae** las siete especies estudiadas citogenéticamente se caracterizan por presentar un número cromosómico diploide comprendido entre 11 ( $8+2m+X_0$ ) y 17 ( $14+2m+X_0$ ), un mecanismo de determinación sexual de tipo  $X_0/XX$  y un par de cromosomas  $m$  (Ueshima 1979).

Ray-Chaudhuri y Manna (1955) describieron la presencia de un sistema cromosómico múltiple de determinación del sexo en *Physopelta schlanbuschi*, la cual posee un número cromosómico diploide  $2n=17$  ( $12+2m+X_1X_2Y$ ), siendo la única especie conocida de la familia Largidae que posee un cromosoma sexual Y (Ueshima 1979).

Las **Lygaeidae** *sensu lato* son tal vez uno de los grupos más estudiados desde el punto de vista citogenético y que presenta mayor heterogeneidad. Los números espermatozonales de las 350 especies analizadas cromosómicamente varían entre 11 ( $8+2m+X_0$ ) y 30 ( $26+2m+XY$ ). El valor más frecuente de la distribución es  $2n=14$  ( $10+2m+XY$ ), presente en alrededor de 38% de las especies analizadas, y 32% posee  $2n=16$  ( $12+2m+XY$ ). El sistema cromosómico de determinación del sexo más frecuente es XY/XX, si bien algunas tribus o géneros se caracterizan por presentar el sistema  $X_0/XX$ , como ser Pachygronthini (Pachygronthinae), Lethaeini y el género *Poecantius* de la tribu Rhyparochromini (Rhyparochrominae). Dentro de la familia Lygaeidae, sistemas múltiples del tipo  $X_nY/X_nX_n$  sólo se han descripto en diez especies pertenecientes a las subfamilias Blissinae, Lygaeinae, Oxycareninae y Rhyparochrominae (Pfaler-Collander 1941, Yosida 1946, Menon 1955, Banerjee 1958, Jande 1959, Ueshima & Ashlock 1980); únicamente en *Rhyparochromus angustatus* (Rhyparochrominae) se observó la presencia de un sistema múltiple del tipo  $XY_n$  (Takenouchi & Mutamoto 1968). Otra característica de esta familia es la presencia de cromosomas *m*, que sólo estarían ausentes en las especies de Lygaeinae y Oxycareninae (Ueshima 1979, Manna 1984).

Los estudios citogenéticos realizados en 16 especies de **Pyrhcoridae** revelaron que esta familia se caracteriza citogenéticamente por ser un grupo heterogéneo (Ueshima 1979). El número cromosómico varía entre  $2n=13$  ( $12+X_0$ ) y  $2n=33$  ( $32+X_0$ ) y los sistemas cromosómicos de determinación del sexo que han sido descriptos son:  $X_0/XX$  y  $X_1X_2X_0/X_1X_1X_2X_2$  (Ueshima 1979). A pesar de la gran diversidad de especies existente en esta familia, los datos citogenéticos disponibles del género *Dysdercus* son escasos. Hasta el presente, sólo siete especies de *Dysdercus* del Viejo Mundo y cinco del Nuevo Mundo han sido analizadas citogenéticamente, las cuales se caracterizan por poseer un número cromosómico diploide entre  $2n=13$  y  $2n=16$  (Ueshima 1979, Manna & Deb-Mallick 1981). Asimismo, se ha descripto la presencia de los sistemas múltiples de determinación del sexo  $X_1X_2X_0$  en *Pyrrhopeplus posthumus* (Parshad 1957a) y  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_0$  en *Iphita limbata*, aunque se desconoce exactamente el comportamiento de sus seis cromosomas X durante la meiosis (Banerjee 1959, Ueshima 1979).

Dentro de la familia **Rhopalidae** han sido analizadas 24 especies pertenecientes a 12 géneros, las cuales se caracterizan por presentar un complemento cromosómico diploide de 13, un sistema cromosómico de determinación del sexo  $X_0/XX$  y la presencia de un par de cromosomas *m* (Ueshima 1979, Manna 1984).

## OBJETIVOS DEL ESTUDIO

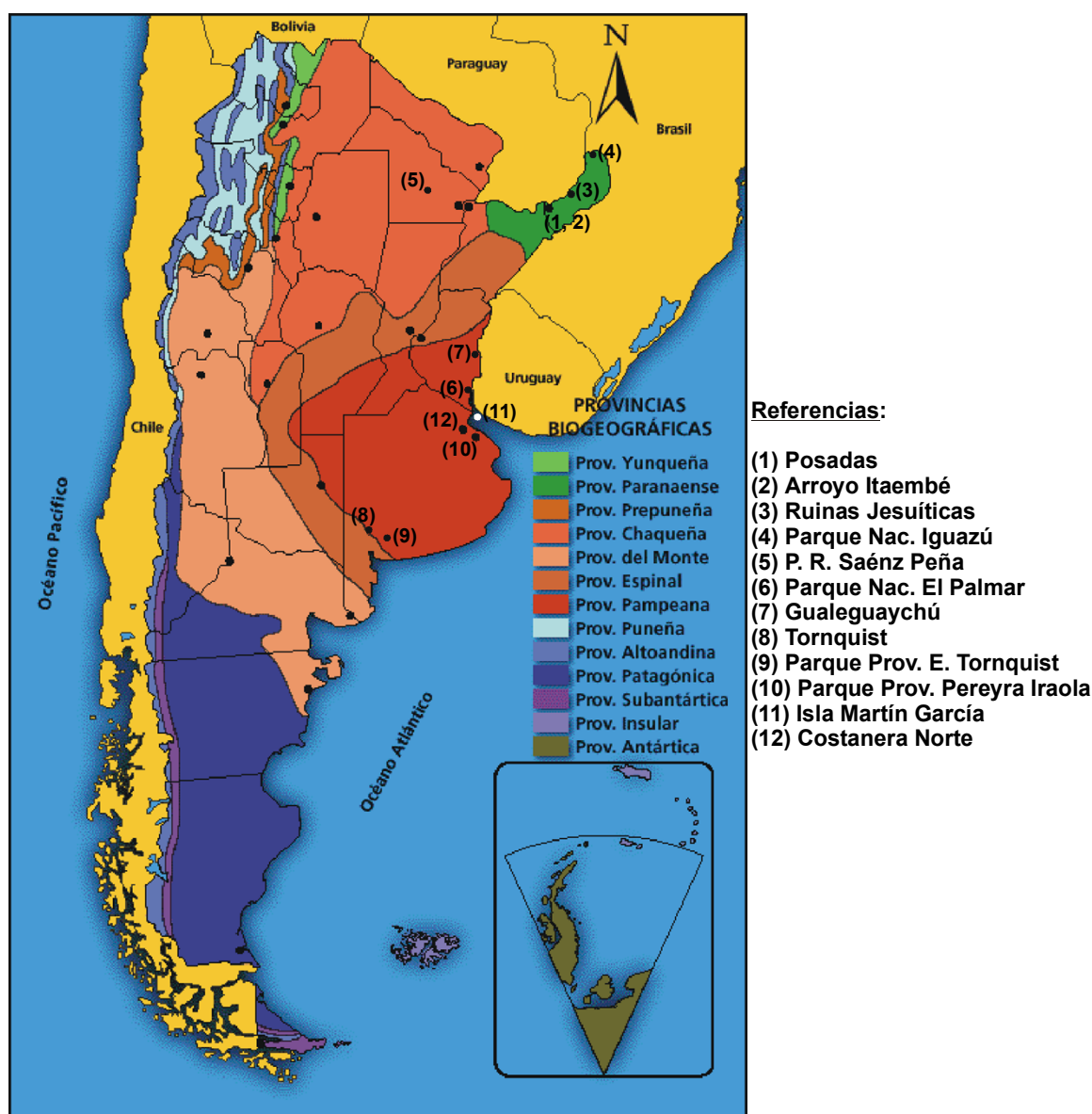
El presente Trabajo de Tesis presenta los siguientes objetivos:

- ◆ Realizar estudios citogenéticos en especies de Heteropteros fitófagos de interés agroeconómico en la Argentina, con el fin de intentar responder a algunos de los interrogantes planteados en relación con el complemento cromosómico, el desarrollo meiótico y el comportamiento de los cromosomas holocinéticos.
- ◆ A partir de los estudios citogenéticos realizados en las especies en estudio, tratar de dilucidar los mecanismos involucrados en el origen de sus variaciones intra e interpoblacionales.
- ◆ Tratar de ampliar el conocimiento acerca de la citogenética de los Heteroptera, y así poder brindar un aporte a su sistemática y taxonomía.

## MATERIALES Y METODOS

## 5. Colección

Los insectos estudiados fueron recolectados en los viajes realizados a los distritos biogeográficos de las provincias Paranaense (dominio Amazónico), Chaqueña, del Espinal y Pampeana (dominio Chaqueño) de la Región Neotropical (Cabrera & Willink 1980) (Figura 2) (Tabla 1).



**Figura 2.** Ubicación geográfica de los sitios de procedencia del material estudiado en mapa de las Provincias Biogeográficas en la Argentina.



**Tabla 1.** Material utilizado para los estudios citogenéticos y citogenético-moleculares de Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae

Taxón	Total ejemplares	Procedencia y Situación Geográfica	Fecha	Colector
<i>Athaumastus haematicus</i>	16	Localidad de Gualaguaychú (provincia de Entre Ríos) 33° 01'/58° 31'	II/1997	M.J. Bressa
<i>Hypsilonotus bitriangulifer</i> <i>bitriangulifer</i>	5	Parque Nacional El Palmar (provincia de Entre Ríos) 32° 14'/58° 08'	IV/1995	M.A. Feuerschwenger M. J. Bressa
	12	Parque Nacional Iguazú (provincia de Misiones) 25° 36'/54° 34'	IV/2000 <sup>a</sup> VI/2000 <sup>b</sup>	M. Kohan <sup>a, b</sup> M.L. Larramendy <sup>a, b</sup> M.J. Bressa <sup>a</sup>
<i>Leptoglossus impictus</i>	16	Localidad de Gualaguaychú (provincia de Entre Ríos) 33° 01'/58° 31'	II/1997	M.J. Bressa
<i>Phthia picta</i>	14	Localidad de Gualaguaychú (provincia de Entre Ríos) 33° 01'/58° 31'	II/1997	M.J. Bressa
<i>Largus fasciatus</i>	30	Localidad de Tornquist (provincia de Buenos Aires) 38° 06'/62° 14'	V/1995	M.L. Larramendy
<i>Largus rufipennis</i>	15	Costanera Norte (ciudad Autónoma de Buenos Aires) 34° 38'/58° 28'	I/1998 <sup>a</sup> II/1998 <sup>b</sup>	P.J. Rebagliati <sup>a, b</sup> S. Rodríguez Gil <sup>a, b</sup>
	25	Parque Provincial E. Tornquist (provincia de Buenos Aires) 38° 08'/61° 47'	XI/1996 <sup>a</sup> III/1998 <sup>b</sup>	M.A. Feuerschwenger <sup>a, b</sup> M. J. Bressa <sup>a, b</sup>
	7	Arroyo Itaembé (Posadas, provincia de Misiones) 27° 22'/55° 53'	XI/1995	D. Carpintero
	27	Localidad de Posadas (provincia de Misiones) 27° 22'/55° 53'	X/1998	M.A. Feuerschwenger M.J. Bressa
	14	Parque Nacional Iguazú (provincia de Misiones) 25° 36'/54° 34'	IV/2000 <sup>a</sup> VI/2000 <sup>b</sup>	M. Kohan <sup>a, b</sup> M.L. Larramendy <sup>a, b</sup> M.J. Bressa <sup>a</sup>
<i>Lygaeus alboornatus</i>	32	Parque Provincial E. Tornquist (provincia de Buenos Aires) 38° 08'/61° 47'	XI/1996 <sup>a</sup> XII/2000 <sup>a</sup>	M.A. Feuerschwenger <sup>a, b</sup> M.J. Bressa <sup>a, b</sup>



<i>Dysdercus albofasciatus</i>	100	Parque Provincial P. Iraola (provincia de Buenos Aires) 34° 51'/58° 05'	XI/1999 <sup>a</sup> I/2000 <sup>b</sup> II/2000 <sup>c</sup> XII/2000 <sup>d</sup>	V. Frassa <sup>e, f</sup> S. Ituarte <sup>e, f</sup> M. Kohan <sup>a-c</sup> M.L. Larramendy <sup>a-f</sup>
	19	Reserva Provincial isla Martín García (provincia de Buenos Aires) 34° 22'/58° 15'	XI/1996 <sup>a</sup> II/2001 <sup>b</sup>	M.A. Feuerschwenger <sup>a</sup> A.G. Papeschi <sup>b</sup> M.J. Bressa <sup>a, b</sup>
	25	Parque Nacional El Palmar (provincia de Entre Ríos) 32° 14'/58° 08'	X/1998	M.A. Feuerschwenger M.J. Bressa
	2	Localidad Gualaguaychú (provincia de Entre Ríos) 33° 01'/58° 31'	II/1997	M.J. Bressa
	8	Parque Nacional Iguazú (provincia de Misiones) 25° 36'/54° 34'	X/1998	M.A. Feuerschwenger M.J. Bressa
	13	Ruinas Jesuíticas (San Ignacio, provincia de Misiones) 30° 58'/64° 31'	X/1998	M.A. Feuerschwenger M.J. Bressa
<i>Dysdercus chaquensis</i>	40	Localidad P. R. Saenz Peña (provincia de Chaco) 26° 47'/60° 27'	IV/1999	M.A. Feuerschwenger M.J. Bressa
	20	Ejemplares de Bioterio, Laboratorio de Parasitología del Museo Argentino de Historia Natural “Bernardino Rivadavia” 34° 38'/58° 28'	XI/1997 <sup>a</sup> III/1998 <sup>b</sup>	Dr. T. Stadler <sup>a, b</sup> F. Tricarico <sup>a, b</sup>
<i>Dysdercus imitator</i>	16	Parque Nacional Iguazú (provincia de Misiones) 25° 36'/54° 34'	IV/2000 <sup>a</sup> VI/2000 <sup>b</sup>	M. Kohan <sup>a, b</sup> M.L. Larramendy <sup>a, b</sup> M.J. Bressa <sup>a</sup>
<i>Dysdercus ruficollis</i>	28	Reserva Provincial isla Martín García (provincia de Buenos Aires) 34° 22'/58° 15'	X/1995 <sup>a</sup> I/1996 <sup>b</sup> XI/1996 <sup>c</sup> I/1997 <sup>d</sup> I/1998 <sup>e</sup> II/2001 <sup>f</sup>	M.A. Feuerschwenger <sup>a</sup> M.L. Larramendy <sup>b, c, e</sup> A.G. Papeschi <sup>e, f</sup> M.J. Bressa <sup>a-f</sup>
	3	Parque Nacional El Palmar (provincia de Entre Ríos) 32° 14'/58° 08'	X/1998	M.A. Feuerschwenger M.J. Bressa
	5	Arroyo Itaembé (Posadas, provincia de Misiones) 27° 22'/55° 53'	XI/1995	D. Carpintero

<i>Jadera haematoloma</i>	9	Reserva Provincial isla Martín García (provincia de Buenos Aires) 34° 22'/58° 15'	XI/1995 <sup>a</sup> XI/1996 <sup>b</sup>	M.A. Feuerschwenger <sup>a</sup> M.J. Bressa <sup>a, b</sup>
	2	Localidad Gualaguaychú (provincia de Entre Ríos) 33° 01'/58° 31'	II/1997	M.J. Bressa
<i>Jadera sanguinolenta</i>	11	Reserva Provincial isla Martín García (provincia de Buenos Aires) 34° 22'/58° 15'	XI/1995	M.A. Feuerschwenger M.J. Bressa
	16	Localidad Gualaguaychú (provincia de Entre Ríos) 33° 01'/58° 31'	II/1997	M.J. Bressa
	54	Parque Nacional Iguazú (provincia de Misiones) 25° 36'/54° 34'	IV/2000 <sup>a</sup> VI/2000 <sup>b</sup>	M. Kohan <sup>a, b</sup> M.L. Larramendy <sup>a, b</sup> M.J. Bressa <sup>a</sup>
	11	Ruinas Jesuíticas (San Ignacio, provincia de Misiones) 30° 58'/64° 31'	X/1998	M.A. Feuerschwenger M.J. Bressa

Si bien hay una multitud de equipos diseñados para hacer colectas especializadas, la red de rastreo, el “paraguas” y el aspirador son los adminículos más convenientes para recolectar las especies fitófagas.

La red de rastreo es una bolsa de lienzo o tul tipo popelina atada a un aro de alambre acerado fuerte, colocado en un mango de madera. Esta red se utiliza para colectar barriendo los pastizales, plantas y ramas de arbustos.

El “paraguas” se trata de un paño cuadrado de aproximadamente un metro por lado, sostenido por dos varillas atravesadas, de modo que quede flojo. Este equipo se usa colocándolo bajo las ramas, plantas, troncos, que se golpean para hacer caer los especímenes que allí se refugian, los cuales son recogidos posteriormente con pinzas.

El aspirador es un aparato que por un lado se aspira con la boca y por el otro pasan los ejemplares, manteniéndose en su interior un papel arrugado de manera que caminen en él y no se amontonen unos con otros. Asimismo, otro elemento indispensable para poder realizar la recolección son las pinzas finas.

## **6. Citogenética Básica**

### **6.1.Fijación**

La gran mayoría de los ejemplares machos adultos se fijaron enteros a campo en una mezcla de alcohol metílico y ácido acético glacial en una proporción 3:1, habiéndoseles practicado previamente una incisión ventral a los lados del abdomen. Para ello se utilizó un frasco de boca ancha para evitar la rotura de los ejemplares. Después de una hora a temperatura ambiente, los frascos con los ejemplares fijados se conservaron a 4°C.

Algunos ejemplares se trasladaron vivos al laboratorio en recipientes de plástico y/o cajas acondicionados adecuadamente con muestras de las plantas del lugar de colección, con el fin de fijar únicamente las gónadas en una mezcla de alcohol metílico y ácido acético glacial (3:1) y posteriormente conservarlas a 4°C.

Paralelamente, representantes de las muestras fueron matados en frascos de boca ancha con cianuro de potasio (KCN) para su ulterior determinación taxonómica. Los ejemplares permanecieron en dichos frascos durante no más de seis horas, pues la coloración sufre alteraciones por efecto de los gases de cianhídrico y de la humedad.

Una vez muertos, se sacaron del frasco con una pinza y se dispusieron en hileras en camas de algodón indicando con una etiqueta localidad, fecha, nombre del colector y todo otro dato de interés. La cama de algodón consta de dos tiras anchas de papel cruzadas, que llevan una fina capa de algodón. En el laboratorio se colocaron directamente en una cámara húmeda -que es un algodón humedecido con un micostático- para poder llevar a cabo el montaje con alfileres entomológicos y se dejaron 24 hs para ablandar los tejidos. Luego se extendieron las patas, antenas y alas para realizar el montaje con alfileres entomológicos que tienen un largo estandarizado y un grosor indicado desde el N° 000 al 7, siendo los más recomendables el N° 1, 2 y 3. Finalmente, los ejemplares se conservaron en cajas entomológicas, portando una tarjeta donde se consignaron los datos individuales de cada ejemplar (localidad, planta huésped, fecha, nombre del colector, etc.) y una segunda tarjeta con la determinación específica.

### **6.2. Determinación taxonómica**

La determinación taxonómica de los ejemplares fue realizada por el Dr. Axel Bachmann y la Licenciada María Marta Schang, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la

Universidad de Buenos Aires; por el Dr. Harry Brailovsky, de la Universidad Autónoma de México, y por el Dr. Pieter H. van Doesburg, Emeritus Curator of Entomology Research Associate of National Natural History Museum de Leiden, Holanda.

### **6.3. Disección de las gonadas**

La disección de los ejemplares se realizó en el laboratorio con microscopio binocular estereoscópico en una cámara de Petri, con el interior recubierto con parafina. Se agregó a la cámara alcohol etílico 70% para los ejemplares fijados enteros, o solución salina para los especímenes vivos. Los ejemplares se pincharon a la parafina con un alfiler entomológico a nivel del escutelo, se separaron los hemiélitros y el segundo par de alas, y se practicaron un par de cortes a la altura de los primeros segmentos abdominales. Los tergos de dichos segmentos se levantaron con una pinza entomológica, quedando expuestas las gónadas.

Todos los machos adultos disecados para el estudio de la meiosis se conservaron secos en cajas entomológicas y/o en alcohol etílico 70% para su posterior comparación y determinación taxonómica.

### **6.4. Confección de preparados citogenéticos con hematoxilina férrica acética**

Los preparados meióticos temporarios se realizaron mediante el método de aplastado bajo cubreobjetos o “squash”, utilizando como colorante hematoxilina férrica acética. Debido a que no es posible aislar los folículos testiculares, los preparados se realizaron con un trozo de gonada, descartando la vesícula seminal con el objeto de minimizar la cantidad de espermatozoides.

Asimismo, dado que con el transcurso del tiempo de fijación el material fijado se endurece y el citoplasma de las células se tiñe más intensamente, los mejores preparados cromosómicos se obtuvieron a partir de material con poco tiempo de fijación, entre uno y tres meses.

Una vez revisados todos los preparados temporarios, los mejores se analizaron citogenéticamente y luego se hicieron permanentes por el método de congelamiento. Por último, las mejores células de cada preparado citogenético temporario se fotografiaron y/o captaron mediante una cámara digital.

### **6.5. Confección de preparados citogenéticos para posterior tinción con 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Feulgen e impregnación argéntica**

Los preparados citogenéticos destinados a una coloración con DAPI se realizaron mediante el método de aplastado bajo cubreobjetos o “squash” en ácido acético 45%, congelando los preparados en hielo seco y saltando el cubreobjeto. Posteriormente, se colocaron en alcohol etílico absoluto durante uno a dos minutos y en alcohol metílico durante una hora y media a dos horas. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos horas y, por último, se tiñeron con solución de DAPI en oscuridad (Vectashield mounting medium H1200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU) y se conservaron a 4 °C hasta su observación con microscopio de fluorescencia.

La técnica de tinción con Feulgen se realizó a partir de un trozo de gonada fijada y luego tratada con HCL 1N a 60°C durante 8-10 min. Inmediatamente, el material se trató con reactivo de Schiff's a temperatura ambiente durante 30 min, o hasta que los tejidos se tiñieran de color púrpura. Los preparados citogenéticos se realizaron mediante el método de aplastado bajo cubreobjetos o “squash” en orceína acética. Las preparaciones se analizaron en el mismo día y se conservaron a 4 °C.

Los preparados citogenéticos destinados a una impregnación con NO<sub>3</sub>Ag se realizaron con un trozo de gonada en ácido acético 45% por el método de aplastado bajo cubreobjetos, congelando los preparados en hielo seco durante 30 min y saltando el cubreobjeto. Una vez secos los preparados, se procedió a la impregnación argéntica de acuerdo con la técnica propuesta por Rufas (1982). Brevemente, se colocó sobre el preparado una gota de solución de NO<sub>3</sub>Ag 50% en agua bidestilada, previamente ajustada a pH 3 con ácido fórmico; se incubó en cámara húmeda a 60°C durante un mínimo de 5 min, controlando la coloración con microscopio. La tinción se interrumpe lavando en agua destilada, y una vez que se han secado los preparados, se montan en Euparal.

### **6.6. Análisis citogenético**

El análisis de los preparados teñidos con DAPI se realizó en los microscopios de fluorescencia Zeiss Laborlux con filtro 09 Zeiss, y Olympus BX 50 equipado con una apropiada combinación de filtros.

Las fotomicrografías se tomaron en un Microscopio Leica DMLB, con película Kodak Imagelink HQ (Estar Base, 35mm), y las imágenes de las células se capturaron con una cámara

digital para captura automática de imágenes Leica DC100 y se procesaron mediante el programa Leica IM50 Image Manager (Imagic Bildverarebeitung AG).

### **6.7. Análisis estadístico**

Los procedimientos estadísticos empleados en el presente trabajo de Tesis correspondientes a análisis de varianza, análisis de regresión, cálculo de intervalos de confianza y contrastes estadísticos han sido desarrollados de acuerdo a la metodología detallada (Sokal & Rohlf 1995).

## **7. Estudios Molecular y Citogenético-Molecular**

### **7.1 Fijación**

Algunas de las hembras adultas se fijaron en una mezcla de alcohol metílico y alcohol etílico (1:1), y posteriormente se mantuvieron a 4°C; mientras que otros ejemplares se conservaron en nitrógeno líquido. Independientemente de la fijación, todos los individuos se destinaron para extracción de ADN genómico total.

### **7.2 Protocolos de extracción de ADN genómico total**

Se realizaron y evaluaron los siguientes métodos de extracción de ADN genómico total de los insectos en estudio:

- (1) método de extracción N° 1: extracción de ADN genómico total mediante una digestión doble (ver página 41),
- (2) método de extracción N° 2: extracción de ADN genómico total siguiendo el protocolo propuesto por Marchant (1988) (ver página 42),
- (3) método de extracción N° 3: extracción de ADN genómico total mediante el protocolo de Marchant modificado (ver página 43),
- (4) método de extracción N° 4: extracción de ADN genómico total mediante el protocolo DNAIzo3E (ver página 44).

Asimismo, varias de las muestras de ADN resultantes a partir de los distintos métodos de extracción de ADN, se sometieron a una posterior purificación del ADN usando el método de precipitación con espermina (Hoopes & Mc Clure 1981, Reineke et al. 1998).

A continuación se detallan los pasos involucrados en los distintos protocolos de extracción de ADN genómico total utilizados:

#### Protocolo de extracción de ADN genómico total N° 1

1. Fijar los insectos enteros en alcohol metílico:alcohol etílico (1:1).
2. Triturar y macerar los ejemplares con EDTA salino (4 ml) en una cámara de petri estéril.
3. Enjuagar el material dos veces con EDTA salino y descartar la fase líquida.
4. Resuspender el material en SDS (200 µl) y EDTA salino fresco (4 ml) en un tubo cónico estéril de 15 ml.
5. Agregar proteinasa K (400 µg/ml; 160 µl) e incubar en un baño termostático a 70°C durante dos horas y media.
6. Agregar fenol equilibrado con Tris-HCl (pH 7,5; 4 ml).
7. Someter el material a rotación durante 10 min y centrifugar a 2.500 rpm durante 10 min.
8. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo cónico estéril y agregar fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (2:2 ml).
9. Someter el material a una segunda rotación durante 10 min y centrifugar a 1.500 rpm durante 10 min.
10. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo cónico estéril y agregar cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (4 ml).
11. Someter el material a una tercera rotación durante 10 min y centrifugar a 1.500 rpm durante 10 min.
12. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo cónico estéril.
13. Adicionar alcohol etílico absoluto frío (-20°C) (8 ml) y conservar en freezer durante 20 min.
14. Centrifugar a 1.500 rpm durante 10 min.
15. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con alcohol etílico 70% frío (-20°C).
16. Descartar el sobrenadante y colocar los tubos cónicos boca abajo para que se evapore todo el alcohol.
17. Resuspender el ADN en solución tampón TE (500 µl).
18. Incubar con ARNasa (10 mg/ml; 10 µl) a 37°C durante una hora.

19. Medir la concentración del ADN mediante un espectrofotómetro y realizar una corrida electroforética en gel de agarosa (1,5%) a 100 volts/cm durante 80 min.

#### Protocolo de extracción de ADN genómico total N° 2

1. Conservar los insectos enteros en nitrógeno líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
2. Triturar y macerar los ejemplares con nitrógeno líquido en un mortero.
3. Pasar el polvo fino obtenido a un tubo cónico de 15 ml, agregar solución tampón de extracción (5ml) con proteinasa K (20 mg/ml; 400  $\mu\text{l}$ ) y mezclar por inversión.
4. Incubar en un baño termostático a  $37^{\circ}\text{C}$  entre una hora y media y dos horas.
5. Agregar fenol equilibrado con Tris-HCl (pH 7,5; 3ml).
6. Agitar fuerte un par de veces, coocar alicuotas en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
7. Pasar el sobrenadante (4 ml) a un nuevo tubo cónico de 15 ml estéril y mantenerlo en un recipiente con hielo.
8. Adicionar dos volúmenes de perclorato de sodio 2,9M y agitar suavemente.
9. Conservar en freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante una hora.
10. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
11. Descartar el sobrenadante y agregar alcohol etílico 70% frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) (1 ml), bañando las paredes del tubo cónico.
12. Cortar la punta de un tip estéril de 1 ml, tomar el precipitado y pasarlo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril.
13. Agregar alcohol etílico 70% frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) (1 ml) y centrifugar a 12.000-13.000 rpm durante 10 min.
14. Descartar el sobrenadante y colocar los tubos de microcentrífuga boca abajo para que se evapore todo el alcohol.
15. Resuspender el ADN en solución tampón TE (300  $\mu\text{l}$ ).
16. Si los precipitados no están limpios, proceder a una nueva extracción fenólica. Agregar solución tampón TE (150  $\mu\text{l}$ ) y agua destilada estéril (150  $\mu\text{l}$ ).
17. Agregar un volumen de fenol (300  $\mu\text{l}$ ).
18. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
19. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5ml estéril y agregar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (300  $\mu\text{l}$ ).
20. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
21. Pasar el sobrenadante (200  $\mu\text{l}$ ) a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5ml estéril.



22. Agregar un volumen de perclorato de sodio 2,9M (200  $\mu$ l), agitar por inversión y conservar en freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 min.
23. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
24. Descartar el sobrenadante y agregar alcohol etílico 70% frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) (1 ml).
25. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
26. Descartar el sobrenadante y colocar los tubos de microcentrífuga boca abajo para que se evapore todo el alcohol.
27. Resuspender el ADN en solución tampón TE (150  $\mu$ l).
28. Medir la concentración del ADN mediante un fluorómetro y realizar una corrida electroforética en gel de agarosa (1,5%) a 100 volts/cm durante 80 min.

#### Protocolo de extracción de ADN genómico total N° 3

1. Conservar los insectos enteros en nitrógeno líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
2. Triturar y macerar los ejemplares con nitrógeno líquido en un mortero.
3. Pasar el polvo fino obtenido a un tubo cónico de 15 ml estéril, agregar solución tampón de extracción (5 ml) y mezclar por inversión.
4. Agregar proteinasa K (20 mg/ml; 50  $\mu$ l) y  $\beta$ -mercaptoetanol (36  $\mu$ l).
5. Incubar en un baño termostático a  $50^{\circ}\text{C}$  durante dos horas.
6. Centrifugar a 1.500 rpm durante tres minutos.
7. Pasar el sobrenadante (4 ml) a un tubo cónico estéril y agregar fenol equilibrado con Tris-HCl (pH 7,5; 2 ml).
8. Agitar varias veces por inversión, poner alicuotas en cuatro tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
9. Pasar el sobrenadante de cada tubo de microcentrífuga a un nuevo tubo cónico de 15 ml estéril.
10. Agregar fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (1:1 ml) y agitar varias veces por inversión.
11. Poner alicuotas en cuatro tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
12. Pasar el sobrenadante de cada tubo de microcentrífuga a un nuevo tubo cónico de 15 ml estéril.
13. Agregar fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (1:1 ml) y agitar varias veces por inversión.

14. Poner alicuotas en cuatro tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
15. Agregar cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (2 ml) y agitar varias veces por inversión
16. Centrifugar a 2.500 rpm durante 10 min.
17. Tomar el sobrenadante y poner alicuotas en 8 tubos de microcentrífuga de 1,5ml estériles.
18. Agregar a cada tubo de microcentrífuga 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y dos volúmenes y medio de alcohol etílico absoluto frío (-20°C).
19. Conservar en freezer (-20°C) hasta el día siguiente.
20. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 min.
21. Descartar el sobrenadante y agregar alcohol etílico 70% frío (-20°C) (1 ml).
22. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
23. Descartar el sobrenadante y colocar los tubos de microcentrífuga boca abajo para que se evapore todo el alcohol.
24. Agregar alcohol etílico 70% frío (-20°C) (1 ml) y centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
25. Descartar el sobrenadante y colocar los tubos de microcentrífuga boca abajo para que se evapore todo el alcohol.
26. Resuspender el ADN en solución tampón TE (30-40 µl).
27. Incubar en baño termostático a 55°C durante 30 min y conservar en heladera (4°C) hasta el día siguiente.
28. Incubar con ARNasa (10 mg/ml; 1 µl de enzima cada 100 µl de solución tampón TE) a 37°C durante 90 min.
29. Medir la concentración del ADN mediante un fluorómetro y realizar una corrida electroforética en gel de agarosa (1,5%) a 100 volts/cm durante 80 min.

#### Protocolo de extracción de ADN genómico total Nro. 4

1. Conservar los insectos enteros en nitrógeno líquido a -70°C.
2. Triturar y macerar los ejemplares con nitrógeno líquido en un mortero.
3. Pasar el polvo fino obtenido a un tubo cónico de 15 ml estéril, agregar solución tampón de extracción (3,95 ml) y mezclar por inversión.
4. Agregar proteinasa K (20 mg/ml; 40 µl) y β-mercaptoetanol (30 µl).
5. Incubar en un baño termostático a 50°C durante dos horas.
6. Agregar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (2:2 ml) y agitar suavemente en un “shaker” durante 15 min.

7. Poner alicuotas en cuatro tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles y centrifugar a 5.000 rpm durante 10 min.
8. Pasar el sobrenadante de cada tubo de microcentrífuga a un nuevo tubo cónico de 15 ml estéril.
9. Agregar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y agitar suavemente en un shaker durante 15 min.
10. Poner alicuotas en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles y centrifugar a 5.000 rpm durante 10 min.
11. Pasar el sobrenadante de cada tubo de microcentrífuga a un nuevo tubo cónico de 15 ml estéril.
12. Agregar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (4 ml) y agitar suavemente en un shaker durante 15 min.
13. Poner alicuotas en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles y centrifugar a 5.000 rpm durante 10 min.
14. Pasar el sobrenadante a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles.
15. Agregar a cada tubo de microcentrífuga 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y homogeneizar suavemente.
16. Agregar alcohol etílico absoluto frío (-20°C) (1 ml) y homogeneizar suavemente.
17. Conservar en freezer (-20°C) hasta el día siguiente.
18. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 min.
19. Descartar el sobrenadante y agregar alcohol etílico 70% frío (-20°C) (1 ml).
20. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
21. Descartar el sobrenadante y agregar alcohol etílico absoluto frío (-20°C) (1 ml).
22. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
23. Descartar el sobrenadante y colocar los tubos de microcentrífuga boca abajo para que se evapore todo el alcohol.
24. Resuspender el ADN en solución tampón TE (20-30 µl).
25. Conservar a temperatura ambiente hasta el día siguiente.
26. Incubar con ARNasa (10 mg/ml; 1 µl de enzima cada 100 µl de solución tampón TE) a 37°C durante 90 min.
27. Medir la concentración del ADN mediante un fluorómetro y realizar una corrida electroforética en gel de agarosa (1,5%) a 100 volts/cm durante 80 min.

### **7.3. Purificación adicional del ADN genómico total**

Para la precipitación con espermina (Hoopes & Mc Clure 1981, Reineke et al. 1998), a 50 µl de ADN redissuelto en solución tampón TE se le adicionó tetrahidrocloreuro de espermina 50mM (2 µl).

Las muestras se mezclaron mediante un vortex y se colocaron en hielo durante 15 min. El precipitado se centrifugó a 10.000 rpm durante 12 min y el precipitado se lavó dos veces con alcohol etílico 70% frío (-20°C). Para la extracción de la espermina, se adicionó una solución tampón de intercambio de cationes (200 µl) (un volumen de acetato de sodio 0,3M, un volumen de cloruro de magnesio 10mM y tres volúmenes de alcohol etílico absoluto), se mezcló la solución mediante un vortex y se conservó en hielo por lo menos durante una hora. Luego, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó dos veces con alcohol etílico 70% frío (-20°C). Finalmente, las muestras se dejaron secar y se resuspendieron en solución tampón TE (100 µl).

### **7.4. Medición de la concentración de ADN genómico total**

La concentración de ADN genómico total de las muestras fue medida mediante el uso de un espectrofotómetro y de un fluorómetro.

### **7.5. Electroforesis en geles de agarosa**

Para separar e identificar los fragmentos de ADN genómico total se realizaron electroforesis en geles de agarosa. Los geles se preparan fundiendo la agarosa en presencia de la solución deseada hasta obtener una solución clara y transparente. Luego, la solución fundida es colocada en un portagel y se deja endurecer. Una vez endurecida, la agarosa forma una matriz cuya densidad es determinada por su concentración, la cual depende del tamaño de los fragmentos a ser separados (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Intervalo de separación en geles conteniendo diferentes cantidades de agarosa

Cantidad de agarosa (%)	Intervalo de separación eficiente de moléculas lineales de ADN (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

El procedimiento para la preparación de un gel de agarosa es el siguiente:

1. Colocar una cinta adhesiva en los extremos del portagel formando un recipiente cerrado y los peines sin tocar el piso a una distancia de 0,5-1 mm.
2. Pesar la agarosa para un gel al 1,5% y agregarle solución tampón TE 1X.
3. Colocar la mezcla en horno microondas durante 80 segundos a potencia 50.
4. Colocar la solución en baño a 60°C y luego agregarle bromuro de etidio (concentración final 0,2 µg/ml). Agitar vigorosamente.
5. Colocar la solución de agarosa en el portagel y dejar que endurezca durante 30-45 min a temperatura ambiente.
6. Retirar cuidadosamente la cinta adhesiva del portagel y colocarlo en la cuba electroforética.
7. Llenar la cuba de electroforesis con solución tampón TE, hasta tapar el gel.
8. Agregar en un tubo de microcentrífuga las muestras de ADN genómico total (volumen equivalente a 500 ng), agua bidestilada estéril y solución tampón de carga (2-3 µl), para un volumen final de 15-20 µl. Simultáneamente preparar un tubo de microcentrífuga con ADN del fago Lambda (1 µl), que se utilizó como ADN patrón.
9. Sembrar las muestras de ADN genómico total y aplicar un voltaje de 100 volts/cm durante 80 min.

10. Visualizar y fotografiar los geles en el transiluminador de luz ultravioleta (amplitud de frecuencias de luz U.V. 254/312 nm).

### 7.6. Digestión con endonucleasas de restricción

El ADN genómico total fue digerido con endonucleasas de restricción de alta y de baja frecuencia de corte (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de restricción utilizadas

Endonucleasa de restricción	Secuencia de reconocimiento	Condiciones de reacción
Enzimas de alta frecuencia de corte		
Alu I	5'...AG▼CT...3' 3'...TC▲GA...5'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
Hae III	5'...GG▼CC...3' 3'...CC▲GG...5'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
Taq I	5'...T▼CGA...3' 3'...AGC▲T...3'	1X Solución tampón de digestión con 100µg/ml BSA, 65°C
Hinf I	5'...G▼ANTC...3' 3'...CTNA▲G...3'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
Enzimas de baja frecuencia de corte		
BamH I	5'...G▼GATCC...3' 3'...CCTAG▲G...5'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
Bgl II	5'...A▼GATCT...3' 3'...TCTAG▲A...3'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
EcoR I	5'...G▼AATTC...3' 3'...CTTAA▲G...5'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
EcoR V	5'...GAT▼ATC...3' 3'...CTA▲TAG...5'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
Hind III	5'...A▼AGCTT...3' 3'...TTCGA▲A...3'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
Pst I	5'...CTGCA▼G...3' 3'...G▲ACGTC...3'	1X Solución tampón de digestión con 100µg/ml BSA, 37°C
Sal I	5'...G▼TCGAC...3' 3'...CAGCT▲G...3'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
Sma I	5'...CCC▼GGG...3' 3'...GGG▲CCC...3'	1X Solución tampón de digestión, 37°C
Xba I	5'...T▼CTAGA...3' 3'...AGATC▲T...3'	1X Solución tampón de digestión, 37°C

Para llevar a cabo la digestión de las muestras de ADN se colocaron en un tubo de microcentrífuga estéril un volumen equivalente a 1-2 µg de ADN genómico total, 2 µl de solución tampón de restricción 10X, 2 µl de enzima y llevar a un volumen final de 20 µl a la mezcla de reacción. Luego, se aplicó un pulso de microcentrifugación, se mezcló en un vortex y se aplicó nuevamente un pulso de microcentrifugación. Finalmente, se incubó a la temperatura correspondiente a la enzima hasta el día siguiente. Después de la incubación, las muestras se almacenaron en freezer durante 30-45 min y se conservaron en la heladera a 4°C hasta llevar a cabo la corrida electroforética.

Los fragmentos de restricción se separaron e identificaron mediante electroforesis en unidireccional en geles de agarosa y posteriormente fotografiados. Para tales fines, a las muestras se les agregó 4 µl de solución tampón de carga (volumen final 24 µl), se les aplicó un pulso de microcentrífuga y se sembraron en el gel de agarosa (1,5% en solución tampón TE), teñido con bromuro de etidio (concentración final 0,2 µg/ml). Se aplicó un voltaje de 140 volts/cm durante 5 min y luego 100 volts/cm durante 80 min. Finalmente, los geles se visualizaron y fotografiaron en el transiluminador de luz ultravioleta (amplitud de frecuencias de luz U.V. 254/312 nm).

### **7.7. Extracción y purificación de fragmentos de ADN genómico de geles de agarosa**

La extracción y purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se realizó mediante el kit de extracción QIAquick (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Alemania), que permite eluir fragmentos de 70 pb a 10 kb de geles de agarosa en solución tampón TAE o TBE.

A continuación se detalla el protocolo para la elución de los fragmentos:

1. Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa con un escalpelo limpio.
2. Pesar el trozo de gel en un tubo de microcentrífuga incoloro y adicionar tres volúmenes de la solución tampón QG por volumen de gel (100 mg~100 µl).
3. Incubar a 50°C durante 10 min o hasta que se haya disuelto completamente el trozo de gel.
4. Una vez disuelto, verificar que el color de la mezcla sea amarillo. Si la mezcla es de color violeta o naranja adicionar acetato de sodio 3M (pH 5,0; 10 µl).
5. Adicionar un volumen de alcohol isopropílico por volumen de gel.
6. Colocar la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga colector de 2 ml.
7. Colocar la muestra en la columna QIAquick y centrifugar durante un minuto.
8. Descartar el sobrenadante y colocar nuevamente la columna QIAquick en el mismo tubo colector

9. Adicionar 0,5 ml de solución tampón QG a la columna QIAquick y centrifugar durante un minuto.
10. Lavar adicionando 0,75 ml de solución tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante un minuto.
11. Descartar el sobrenadante y volver a centrifugar la columna QIAquick a 13.000 rpm durante un minuto.
12. Colocar la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml.
13. Para eluir el ADN, adicionar 50 µl de la solución tampón de elución (10mM Tris-HCl, pH 8,5) o agua en el centro de la membrana de la columna QIAquick y centrifugar a máxima velocidad durante un minuto.

### 7.8. Marcaje de la sonda utilizando nick-translation

Para el marcaje de la sonda se utilizó el protocolo del Kit de Gibco BRL 8160SB utilizando fluorocromos unidos a digoxigenina (Dig-11-dUTP). Para tales fines, se prepararon las muestras con 10 µl de la solución A4, que es una mezcla de nucleótidos (dATP, dGTP, dCTP), un volumen de ADN equivalente a 2 µg de éste, 2 µl del fluorocromo mezcla de dig-11dUTP y dTTP (concentración final 0,35mM dig:0,65mM dTTP) y agua destilada hasta 90 µl. Luego se mezcla suavemente y se centrifuga. Se añaden 5 µl de DNA polimerasa + DNAasa I, se mezcla con suavidad y se le da un spin. Se incuba a 15°C durante 90 min. Se adiciona 5 µl de EDTA 300mM como solución tampón stop y 1,25 µl de SDS 5% (p/v). Se adiciona 0,75 µl de SDS 10% y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M. Luego se le agregan dos volúmenes de alcohol etílico absoluto frío (120 µl). Se deja a -20°C hasta el día siguiente. Se centrifuga, se descarta el alcohol y se deja secar. Por último, se adiciona 40 µl de solución tampón TE y se conservan a 4°C en heladera.

### 7.9. Hibridación *in situ*

La técnica de hibridación *in situ* de sondas de ácidos nucleicos a preparaciones cromosómicas involucra cuatro pasos fundamentales:

- (1) la preparación y el marcado de la sonda,
- (2) la reacción de hibridación entre la sonda y el ADN blanco,



- (3) la remoción de la sonda que no se unió o que se hibridó en forma inespecífica,
- (4) la detección visual de los sitios de hibridación.

Antes de realizar la hibridación *in situ*, las preparaciones cromosómicas deben ser sometidas a una serie de pretratamientos y lavados, con el objeto de aumentar la eficiencia de la hibridación y/o disminuir los backgrounds inespecíficos.

El primer paso que se realiza es el tratamiento con RNAsa (100 mg/ml), el cual tiene como finalidad remover el ARN asociado a los cromosomas que luego puede interferir en la unión del ADN de la sonda. Para efectuar dicho tratamiento se utilizan diluciones 1:100 de la solución stock (10 mg/ml) en 2XSSC. A cada preparación cromosómica se le añaden 200 µl de la dilución, se coloca un cubreobjetos de plástico y se incuban a 37°C durante una hora en una cámara húmeda (caja en la que se introduce papel de filtro embebido en 2XSSC). Seguidamente las preparaciones se lavan con 2XSSC en agitación, se efectúan tres lavados de 5 min cada uno. Los cubreobjetos de plástico desprendidos se deben retirar con una pinza.

El segundo tratamiento es con paraformaldehído 4% (p/v). Se incuban las preparaciones con la solución de paraformaldehído durante 10 min a temperatura ambiente. Este paso refuerza la fijación del ADN pero reduce la permeabilidad a la sonda, por tal motivo debe ser estricto en el tiempo. Las preparaciones se lavan en 2XSSC a temperatura ambiente, se realizan tres lavados de 5 min cada uno con agitación.

Luego se procede a la deshidratación, para lo cual los preparados se incuban en alcohol etílico 70%, 90% y absoluto durante tres min en cada uno. Se dejan secar al aire por lo menos durante dos horas.

A continuación de los pretratamientos y lavados, se lleva a cabo la preparación de la mezcla de hibridación inmediatamente antes de su uso. Esta mezcla podría almacenarse a -20°C hasta seis meses.

El procedimiento para preparar dicha mezcla es el siguiente (**Tabla 4**):

1. Adicionar a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml todos los componentes de la mezcla de hibridación, excepto la sonda.
2. Mezclar muy bien en un vortex y centrifugar brevemente.
3. Adicionar la sonda, volver a mezclar y centrifugar brevemente.
4. Desnaturalizar la mezcla de hibridación a 70°C durante 15 min.
5. Incubar en hielo durante 5 min y centrifugar brevemente.
6. Adicionar a cada preparación cromosómica 30 µl de la mezcla de hibridación y colocarles un cubreobjetos.

El factor más importante que limita la sensibilidad de la hibridación *in situ* es la cantidad de background no específico y, por ende, las condiciones de hibridación y los lavados son etapas críticas para la obtención de resultados satisfactorios.

**Tabla 4.** Preparación de la mezcla de hibridación

Solución	Cantidad por preparación (µl)	Concentración final
Formamida <sup>(1)</sup>	15	50%
Sulfato de dextrano <sup>(2)</sup>	6	10%
20X SSC	3	2X
Sonda <sup>(3)</sup>	x	
DNA salmón (10mg/ml)	1	0,3 mg/ml
DNA competidor <sup>(4)</sup>	y	
SDS 10%	1	0,33 mg/ml
Agua	z	
Volumen total	30	

(1), formamida ultrapura, almacenada a -20°C; (2), disuelto en agua y esterilizado por filtración en minipore 0,22 µm; (3), concentración final de la sonda 25-100 ng por preparación para sondas clonadas y 75-200 ng por preparación para ADN genómico; (4), dependiendo de los materiales, añadir en proporción de 2X a 100X.

El método de hibridación comprende los siguientes pasos, que involucran la desnaturalización y la hibridación en sí:

1. Colocar las preparaciones cromosómicas en el termociclador bajo el siguiente programa: 75°C 7 min; 55°C 30 segundos; 45°C 1 min; 42°C 2 min; 40°C 5 min; 38°C 5 min y 37°C tiempo indefinido.
2. Pasar las preparaciones a la cámara húmeda precalentada a 37°C e incubar hasta el día siguiente.

En los lavados post-hibridación se remueve la sonda que se unió de manera inespecífica o que posee poca homología con el ADN blanco. Todas las soluciones se incuban previamente a

45°C y se las mantiene a esa temperatura. Los lavados se hacen con agitación; se colocan las preparaciones en una cubeta y se adicionan secuencialmente las soluciones descartando las anteriores:

1. Lavar en 2XSSC, 3 min a 42°C.
2. Lavar en formamida 20% (v/v) en 0,1XSSC, 10 min a 42°C.
3. Después de los dos primeros lavados (1 y 2) se cambian las cubetas.
4. Lavar en 0,1XSSC, 5 min a 42°C.
5. Lavar en 2XSSC, 5 min a 42°C.
6. Lavar en 4XSSC/tween (0,2%), 5 min a 42°C.
7. Lavar en 4XSSC/tween (0,2%), 5 min a temperatura ambiente.

Durante los últimos lavados se prepara una solución de BSA 5% (p/v) en 4XSSC/tween 0,2%, para poder llevar a cabo la detección visual de los sitios de hibridación. Se adiciona 100µl a cada preparación, se coloca un cubreobjetos de plástico y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiran los cubreobjetos y se drena la solución.

La solución con anti-dig FITC se prepara con un ligero exceso sobre la cantidad adecuada al número de preparaciones; se añaden 50µl a cada preparación, se coloca un cubreobjetos de plástico y se incuban a 37°C durante una hora en cámara húmeda.

Las preparaciones se lavan en 4XSSC/tween 0,2%, tres veces durante 10 min cada una. Se adiciona DAPI (100µl) de una solución stock de 2µg/ml, se colocan cubreobjetos de plástico y se incuban durante 15 min en oscuridad.

Se lava brevemente en 4XSSC/tween 0,2% para eliminar los cubreobjetos, se deja drenar, se añaden dos gotas de antifade y se colocan cubreobjetos de 24x60mm. Para eliminar el líquido excedente, se presionan las preparaciones cromosómicas entre papel de filtros y se conservan en oscuridad. Las preparaciones se observan en el microscopio de epifluorescencia utilizando los siguientes filtros adecuados: el filtro 01 azul para detectar DAPI y el filtro 09 verde para detectar Dig.

## 8. Características y Condiciones de Endocria

La cepa de ejemplares de *Dysdercus chaquensis* Freiberg, 1948 del Laboratorio de Parasitología del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” procede de Finca Tolloche (El Quebrachal, Salta). El tamaño de la colonia original se estableció a partir de 25-30 parejas de

adultos en terrarios de vidrio, de un espesor de 0,5 cm y de un tamaño de 40cm de largo por 20cm de ancho por 30cm de alto. La tapa de los terrarios es una tela de voile, ajustada con cinta elástica.

En el interior de los terrarios se colocaban bebederos con agua destilada y comederos. Los bebederos son cámaras de Petri de plástico de 5,5 cm de diámetro y 1,2 cm de alto. Las tapas de estas cámaras están perforadas en el centro y tienen una esponja sintética de color verde (OASIS), que sobresale 0,3 cm. Los comederos son unos sobres de plástico entramados donde se colocan las semillas de algodón, con un broche para que las semillas se distribuyan en una sola capa. Además, la cámara de cría está equipada con un calefactor.

La cría de los individuos de esta especie se realizó mediante un tipo de apareamiento en masa y bajo condiciones controladas de temperatura ( $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad (70%) y fotoperíodo (12 hs de luz diarias). La humedad se regula mediante agua alojada en una bandeja de plástico ubicada en la dirección de circulación del aire del ventilador del calefactor. El fotoperíodo se regula con dos reflectores (OSRAM) de 400 W/D conectados a un sereno automático desde las 7 hasta las 19 hs.

## RESULTADOS

### 9. Familia Coreidae

#### 9.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Athaumastus haematicus* (Stål, 1859)

El complemento cromosómico diploide de *Athaumastus haematicus* es  $2n = 21/22 = 18 + 2m + X0/18 + 2m + XX$ ; entre los bivalentes autosómicos se distinguen dos pares mayores, dos medianos y cinco menores, siendo los cromosomas  $m$  los más pequeños del complemento. El cromosoma X presenta un tamaño similar a uno de los cromosomas menores.

En leptotene sólo se reconoce el cromosoma sexual del resto de la cromatina por ser marcadamente heteropicnótico positivo –heteropicnosis que persiste hasta diacinesis- y se ubica en la periferia del núcleo (**Figura 3a**). En paquitene el cromosoma X está localizado en la periferia del núcleo; en el estadio difuso los bivalentes autosómicos se descondensan pero no completamente y se observan regiones heteropicnóticas positivas dispersas en el núcleo (**Figura 3b, c**). A partir de diplotene comienzan a condensarse e identificarse los nueve bivalentes autosómicos y el par de cromosomas  $m$  separados, los cuales permanecen como univalentes durante toda la profase meiótica (**Figura 3d**). En diacinesis, los cromosomas  $m$  y el cromosoma X se tornan isopicnóticos (**Figura 3e**). A partir de diacinesis tardía los  $m$  se aproximan y en metafase I se asocian formando un pseudobivalente (pII), que es heteropicnótico negativo (**Figura 3f, g**). En este último estadio los bivalentes autosómicos junto con el univalente sexual se disponen en la placa ecuatorial formando un anillo, mientras que el pseudobivalente  $m$  se ubica en su centro (**Figura 3f, g**). En anafase I tanto los bivalentes autosómicos como los cromosomas  $m$  se dividen reduccionalmente, mientras que el cromosoma X lo hace ecuacionalmente, migrando las cromátides hermanas hacia polos opuestos (**Figura 3h**). De esta manera, en telofase I se observan dos núcleos con 11 cromosomas cada uno ( $9 + m + X$ ), ubicándose el cromosoma  $m$  en su centro y el X fuera del grupo cromosómico principal.

La segunda división meiótica se produce inmediatamente después de la telofase I, sin un período de intercinesis. En metafase II los autosomas y el cromosoma X también se disponen en el plano ecuatorial adoptando una configuración en anillo, y en su centro se localiza el cromosoma  $m$  (**Figura 3i**). En anafase II el cromosoma X se rezaga en su migración hacia uno de los polos; en consecuencia, en telofase II se observan dos núcleos con 11 ( $9A + m + X$ ) y 10

( $9A+m$ ) cromosomas. En telofases tardías se puede observar aun al cromosoma X más condensado y ubicado en la periferia del núcleo.

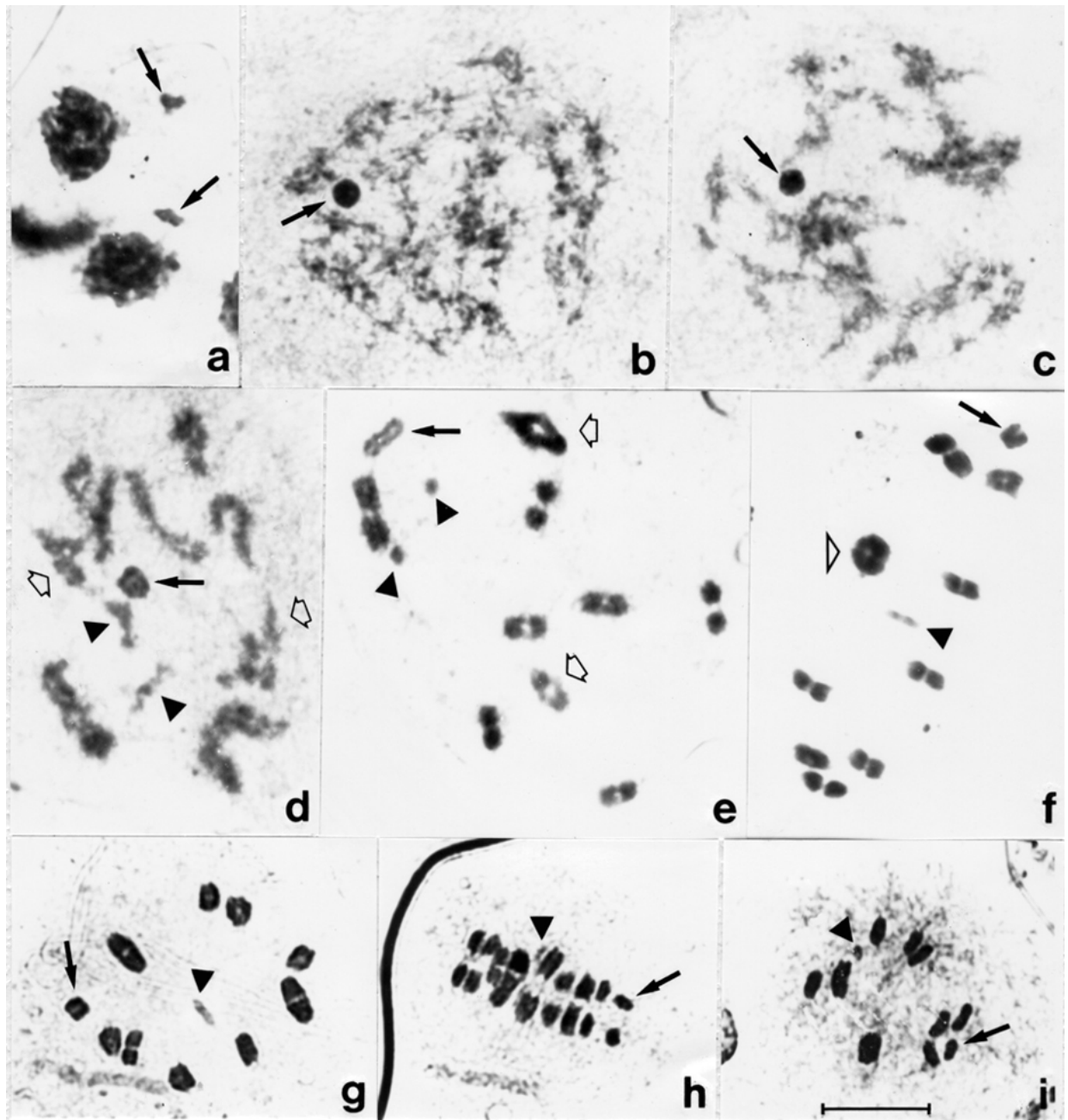
En general, en diacinesis-metafase I los bivalentes autosómicos muestran un único quiasma terminal, aunque los dos bivalentes mayores y, más raramente, los bivalentes medianos pueden presentarlo en posición subterminal o medial (**Figura 3d, e**). Los dos bivalentes mayores y, con menor frecuencia, otros bivalentes presentan dos quiasmas terminales (**Figura 3f**). La frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I es de 9,54, variando entre 9,00 y 9,8 (individuos G-9 y G-5, respectivamente) (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I en *Athaumastus haematicus*

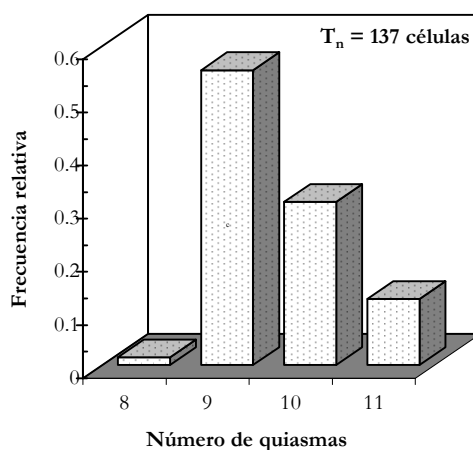
Procedencia	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I <sup>(a)</sup>
Guaileguaychú (Provincia de Entre Ríos)	G-1	7	9,7±0,8 (S= 0,7559/Φ= 6)
	G-2	11	9,3±0,5 (S= 0,6467/Φ= 10)
	G-3	29	9,3±0,2 (S= 0,6038/Φ= 28)
	G-4	27	9,8±0,3 (S= 0,7863/Φ= 26)
	G-5	22	9,8±0,4 (S= 0,7950/Φ= 21)
	G-6	9	9,6±0,7 (S= 0,8819/Φ= 8)
	G-7	7	9,7±0,8 (S= 0,7559/Φ= 6)
	G-8	20	9,4±0,3 (S= 0,5871/Φ= 19)
	G-9	5	9,00 (S= 0/Φ= 4)

<sup>(a)</sup>, los límites fiduciales corresponden a la distribución *t* de Student para un nivel de confianza de 95%, con Φ grados de libertad.

En la **Figura 4** se muestra la distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células en diacinesis-metafase I de los nueve especímenes estudiados. De esta figura se desprende que 86% de las células presentó un número de quiasmas por célula entre 9 y 10 (**Figura 4**).



**Figura 3.** Meiosis en *Athaumastus haematicus*. (a) Leptotene; (b, c) Estadio difuso; (d) Diplotene; (e) Diacinesis, (d, e) las flechas vacías señalan bivalentes autosómicos con un quiasma en posición subterminal o medial; (f, g) Metafase I, cabeza de flecha vacía señala bivalente autosómico con dos quiasmas; (h) Anafase I; (i) Metafase II. Flechas negras: cromosoma sexual X; cabezas de flecha negras: cromosomas *m*. Barra= 10  $\mu$ m.



**Figura 4.** Distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células analizadas en diacinesis-metafase I de *Athaumastus haematicus*. En el histograma la frecuencia relativa se grafica en función del número de quiasmas observados en todas las células en diacinesis-metafase I. La frecuencia relativa se calculó como el número de células que presentan un determinado número de quiasmas dividido el número total de células analizadas ( $T_n$ ).

A los fines de evaluar la hipótesis nula ( $H_0$ ), que consiste en que las frecuencias medias de quiasmas son estadísticamente iguales para todos los individuos se realizó un análisis de varianza comparando la varianza entre individuos respecto de la varianza dentro de cada individuo, relación que tiene una distribución de Fisher (F). El valor calculado del estadístico F es 0,0235. Dado el bajo valor de F calculado se acepta la hipótesis nula.

## 9.2. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer* Berg

El complemento cromosómico de *Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer* es  $2n = 19/20 = 16 + 2m + X0/16 + 2m + XX$  (**Figura 5a-f**). Se distinguen tres bivalentes autosómicos mayores, cinco de tamaño similar y el cromosoma X de menor tamaño, siendo el par de cromosomas  $m$  el más pequeño del complemento (**Figura 5d**).

En diplotene se distinguen todos los bivalentes autosómicos, el par de cromosomas  $m$  y el cromosoma X, al igual que el nucléolo asociado a un bivalente como un cuerpo más claro (**Figura 5a**). En diacinesis los cromosomas  $m$  son ligeramente heteropicnóticos negativos y se van aproximando hacia el final de este estadio (**Figura 5b, c**).



Durante metafase I los bivalentes autosómicos se disponen en la placa ecuatorial formando un anillo, en el centro del cual se ubica el pseudobivalente  $m$  (pII), mientras que el univalente sexual yace generalmente fuera de él (**Figura 5d**). En anafase I tanto los bivalentes autosómicos como los cromosomas  $m$  se dividen reduccionalmente, mientras que el cromosoma X lo hace ecuacionalmente.

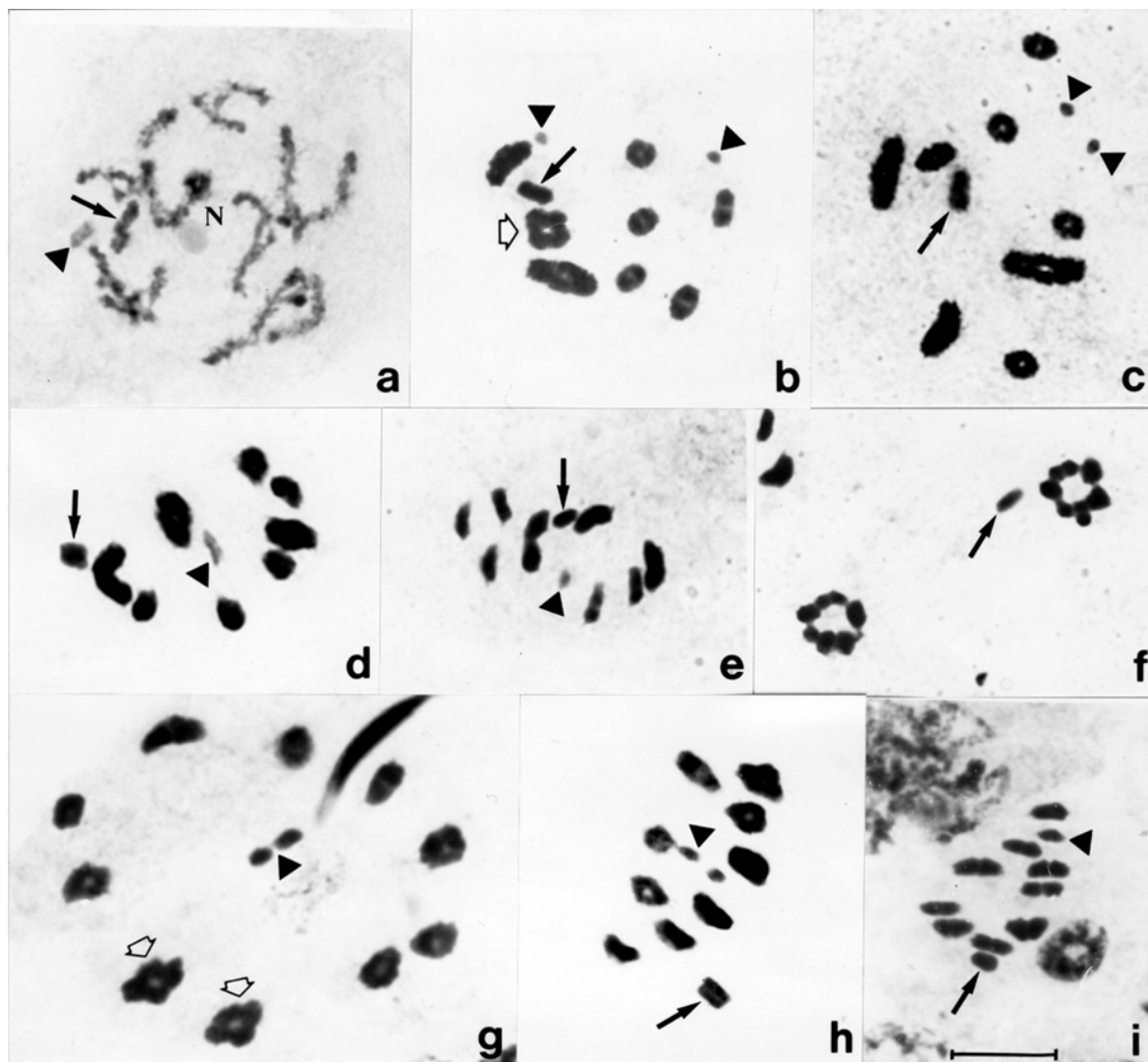
En metafase II la arquitectura de la placa metafásica no es regular, pero el cromosoma  $m$  suele ubicarse en el centro del resto de los autosomas (**Figura 5e**). En anafase II el cromosoma X migra rezagado con respecto a los autosomas (**Figura 5f**) y en telofase II se ubica por fuera del grupo autosómico, formándose como resultado dos núcleos con 10 ( $8A+m+X$ ) y 9 ( $8A+m$ ) cromosomas.

### 9.3. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Phthia picta* (Drury, 1770)

Esta especie presenta un complemento cromosómico  $2n=21/22=18+2m+X0/18+2m+XX$  (**Figura 5g-i**), destacándose un bivalente autosómico por ser de tamaño mayor, mientras que el resto de los bivalentes son similares en tamaño (**Figura 5i**).

En cigotene se distingue al cromosoma X heteropicnótico positivo y a uno o dos nucléolos. En el estadio difuso el cromosoma X permanece condensado y heteropicnótico positivo, mientras que los bivalentes autosómicos no se descondensan completamente, observándose regiones heteropicnóticas positivas dispersas en el núcleo.

En diacinesis se observa que una alta proporción de bivalentes presenta quiasmas intersticiales, los cuales persisten hasta prometafase e incluso hasta metafase I (**Figura 5g, h**). En metafase I los bivalentes autosómicos se disponen formando un anillo y el univalente X se ubica por fuera de él (**Figura 5h**). El par de cromosomas  $m$  es heteropicnótico negativo y forma un pseudobivalente que se ubica en el centro de este anillo (**Figura 5g, h**). En anafase I los bivalentes autosómicos se dividen reduccionalmente, mientras que el X lo hace ecuacionalmente. En metafase II los autosomas se disponen formando un anillo, aunque tanto el cromosoma X como el  $m$  forman parte de éste (**Figura 5i**).



**Figura 5.** Meiosis de *Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer* (a-f) y *Phthia picta* (g-i). (a) Diplotene; (b, c) Diacinesis, (b) flecha vacía señala al bivalente autosómico con quiasma intersticial; (d) Metafase I; (e) Metafase II; (f) Anafase II, flecha negra señala cromosoma sexual X rezagado. *Phthia picta*: (g, h) Metafase I, (g) flechas vacías señalan a los bivalentes autosómicos con quiasmas intersticiales; (i) Metafase II. Flechas negras: cromosoma sexual X; cabezas de flecha negras: cromosomas *m*; N: nucléolo. Barra= 10  $\mu$ m.

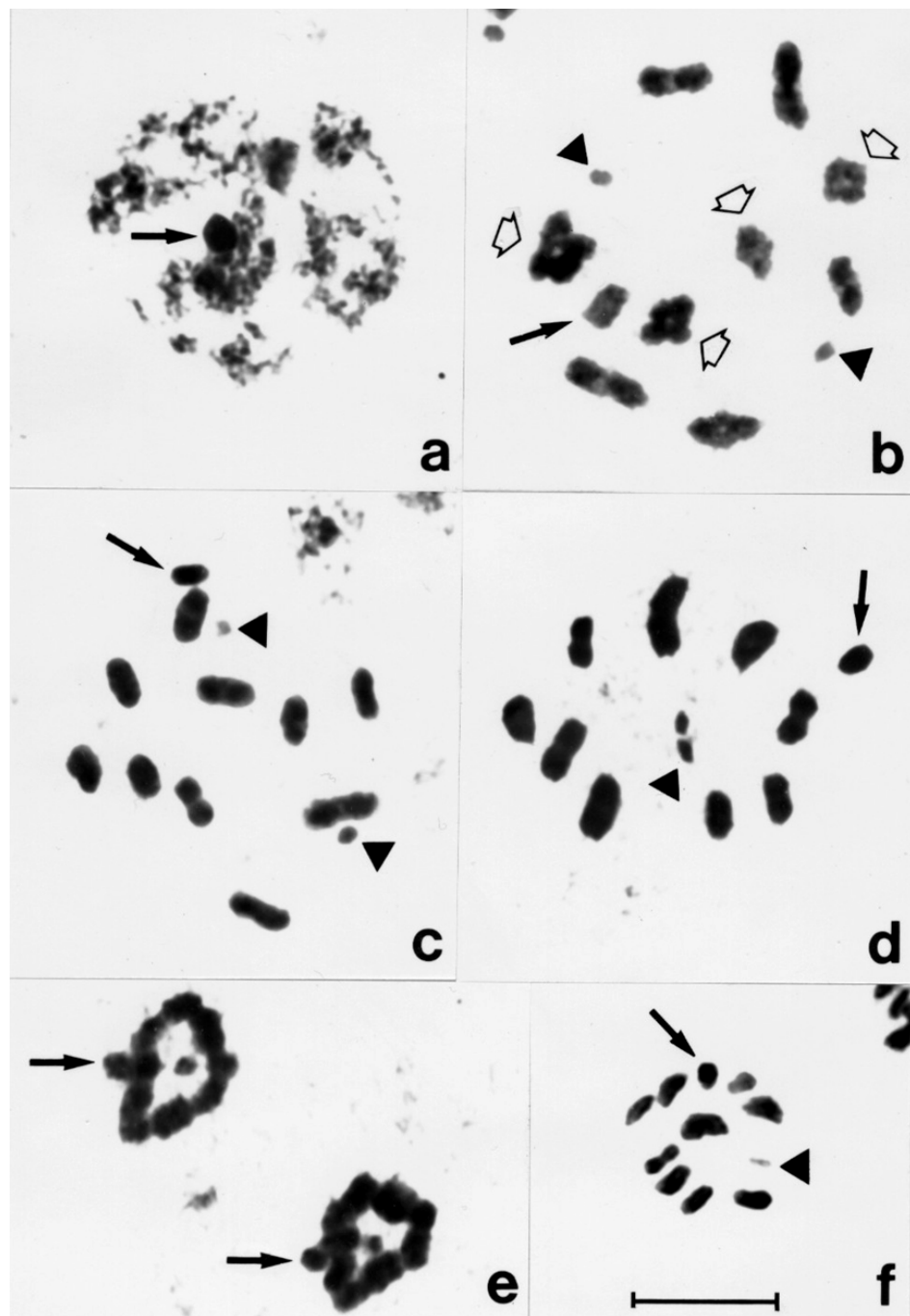
#### 9.4. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Leptoglossus impictus* (Stål, 1859)

Los especímenes analizados de *Leptoglossus impictus* poseen un complemento cromosómico  $2n = 21/22 = 18 + 2m + X0/18 + 2m + XX$  (**Figura 6b-f**), distinguiéndose un par autosómico de gran tamaño, tres pares medianos y el cinco menores, siendo el par de cromosomas *m* el más pequeño del complemento (**Figura 6d**). Durante el estadio difuso sólo es posible observar al cromosoma sexual X por su grado de condensación y su heteropicnosis positiva (**Figura 6a**). En diacinesis todos los bivalentes autosómicos generalmente presentan quiasmas intersticiales (**Figura 6b**) y los cromosomas *m* están separados (**Figura 6b, c**). En metafase I los bivalentes autosómicos se disponen en forma de anillo y el pseudobivalente *m* se ubica en el centro de él, mientras que el cromosoma X se ubica generalmente por fuera del anillo y permanece heteropicnótico positivo (**Figura 6d**). En telofase I los cromosomas *m* se sitúan en el centro del grupo autosómico, mientras que el cromosoma X yace por fuera de éste (**Figura 6e**). En metafase II los autosomas no presentan un arreglo preferencial, aunque el cromosoma X se encuentra a menudo por fuera del grupo autosómico (**Figura 6f**).

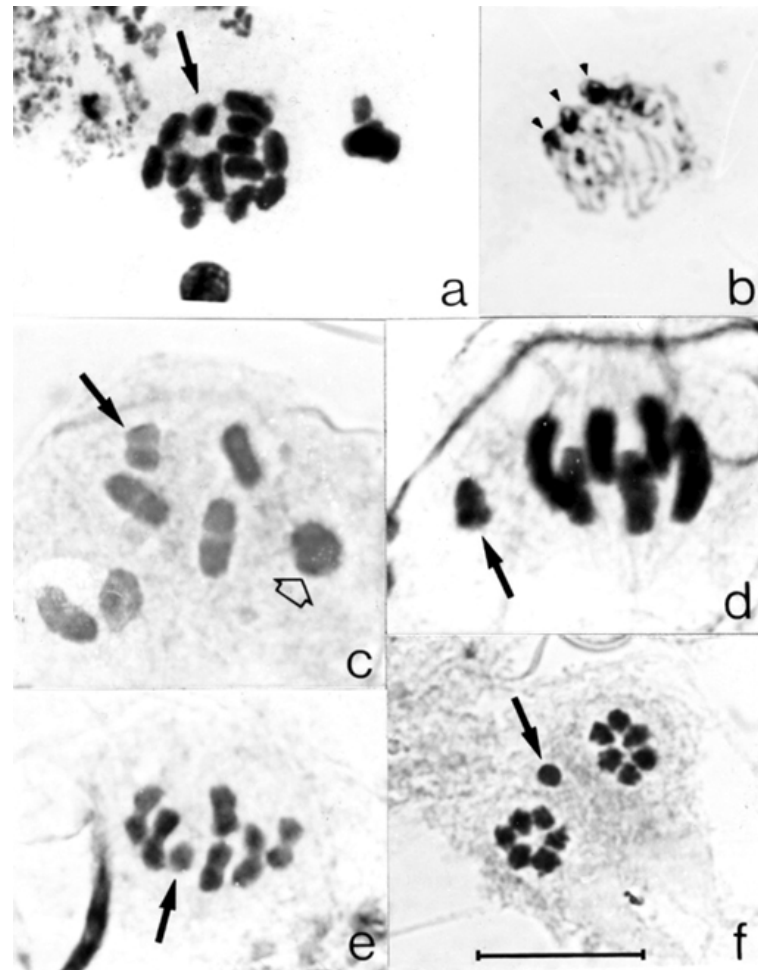
### 10. Familia Largidae

#### 10.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Largus fasciatus* (Blanchard, 1843)

Esta especie presenta un complemento cromosómico diploide  $2n = 13/14 = 12 + X0/12 + XX$  (**Figura 7a**). Los bivalentes autosómicos decrecen gradualmente de tamaño, siendo el cromosoma sexual X el más pequeño del complemento (**Figura 7a, d**). En la profase meiótica temprana, el cromosoma X es heteropicnótico positivo y continúa así hasta diacinesis. En paquitene se observan grandes bloques de heterocromatina en posición telomérica (**Figura 7b**). En diacinesis el cromosoma sexual se torna isopicnótico y los bivalentes autosómicos generalmente presentan un único quiasma terminal (**Figura 7c**). En metafase I y metafase II los autosomas se disponen en anillo, mientras que el univalente sexual X se ubica fuera de él (**Figura 7d, e**). En anafase I los bivalentes autosómicos se dividen reduccionalmente, mientras que el cromosoma X lo hace ecuacionalmente. En telofase II el cromosoma sexual se divide reduccionalmente y se rezaga con respecto al conjunto de autosomas (**Figura 7f**).



**Figura 6.** Meiosis de *Leptoglossus impictus*. (a) Estadio difuso; (b, c) Diacinesis, (b) flechas vacías señalan a los bivalentes autosómicos con quiasmas intersticiales; (d) Metafase I; (e) Telofase I; (f) Metafase II. Flechas negras: cromosoma sexual X; cabezas de flecha negra: cromosomas *m*. Barra= 10  $\mu$ m.

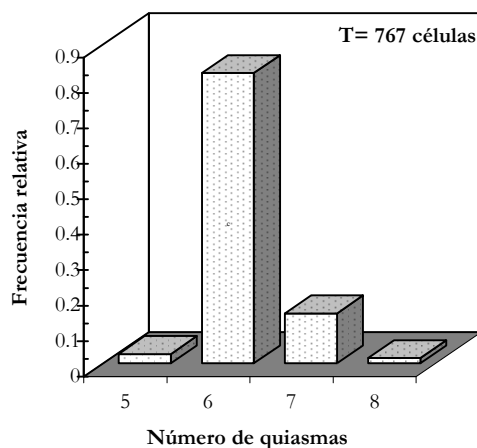


**Figura 7.** Meiosis en *Largus fasciatus*. (a) Prometafase mitótica; (b) Paquitene, cabezas de flecha negras señalan bloques de heterocromatina; (c) Diacinesis, flecha vacía señala bivalente autosómico con dos quiasmas; (d) Metafase I; (e) Metafase II; (f) Telofase II. Flechas negras: cromosoma sexual X. Barra= 10  $\mu$ m.

En metafase I y metafase II los autosomas se disponen en anillo, mientras que el univalente sexual X se ubica fuera de él (**Figura 7d, e**). En anafase I los bivalentes autosómicos se dividen reduccionalmente, mientras que el cromosoma X lo hace ecuacionalmente. En telofase II el cromosoma sexual se divide reduccionalmente y se rezaga con respecto al conjunto de autosomas (**Figura 7f**).

Por lo general, los bivalentes autosómicos presentan un solo quiasma terminal, aunque uno o dos pares autosómicos pueden presentar dos quiasmas terminales (**Figura 7c**). La frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I es de 6,14 (entre 6,0 y 6,6, individuos T-10 y T-7, respectivamente) (**Tabla 6**). En la **Figura 8** se muestra la distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células en diacinesis-metafase I de los especímenes estudiados. Esta figura revela que el número de quiasmas más frecuente es 6 por célula, presente en 82% de la población total de células (**Figura 8**).

Basándose en los resultados de las frecuencias medias de quiasmas obtenidas (**Tabla 6**), se realizó un análisis de varianza para comparar la varianza entre individuos respecto de la varianza dentro de cada individuo, relación que tiene una distribución de Fisher. El valor del estadístico F calculado es 4,7591. El valor de F obtenido de tablas para un nivel de confianza del 95% con 10 y 756 grados de libertad, es 1,8432. Este análisis revela diferencias significativas entre individuos, rechazándose la hipótesis nula.



**Figura 8.** Distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células analizadas en diacinesis-metafase I de *Largus fasciatus*. En el histograma la frecuencia relativa se grafica en función del número de quiasmas observados en todas las células en diacinesis-metafase I. La frecuencia relativa se calculó como el número de células que presentan un determinado número de quiasmas dividido el número total de células analizadas (T).

**Tabla 6.** Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I en *Largus fasciatus*

Procedencia	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I <sup>(a)</sup>
Tornquist (Provincia de Buenos Aires)	T-1	64	6,3±0,1 (S= 0,4672/Φ= 63)
	T-2	2	nd
	T-3	26	6,4±0,3 (S= 0,7524/Φ= 25)
	T-4	91	6,22±0,09 (S= 0,4423/Φ= 90)
	T-5	37	6,1±0,1 (S= 0,4191/Φ= 36)
	T-6	37	6,2±0,1 (S= 0,3737/Φ= 36)
	T-7	10	6,6±0,5 (S= 0,6992/Φ= 9)
	T-8	4	nd
	T-9	143	6,10±0,06 (S= 0,3884/Φ= 142)
	T-10	52	6,0±0,1 (S= 0,3408/Φ= 51)
	T-11	98	6,08±0,07 (S= 0,3420/Φ= 97)
	T-12*	45	6,2±0,2 (S= 0,5290/Φ= 44)
	T-13	164	6,04±0,07 (S= 0,4614/Φ= 163)

<sup>(a)</sup>, los límites fiduciales corresponden a la distribución *t* de Student para un nivel de confianza de 95%, con Φ grados de libertad; nd, frecuencia media de quiasmas no determinada debido al número reducido de células analizadas; \*, cromosoma B en el individuo 12.

Cabe destacar que en un solo individuo de la muestra se observó la presencia de un cromosoma extra sumamente pequeño en 8,89% del total de células analizadas (individuo T-12, **Tabla 6**). Teniendo en cuenta la baja frecuencia de aparición de este cromosoma, podría tratarse de un cromosoma supernumerario o B mitóticamente inestable.



## 10.2. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Largus rufipennis* Laporte, 1832 (PUBLICACION I)

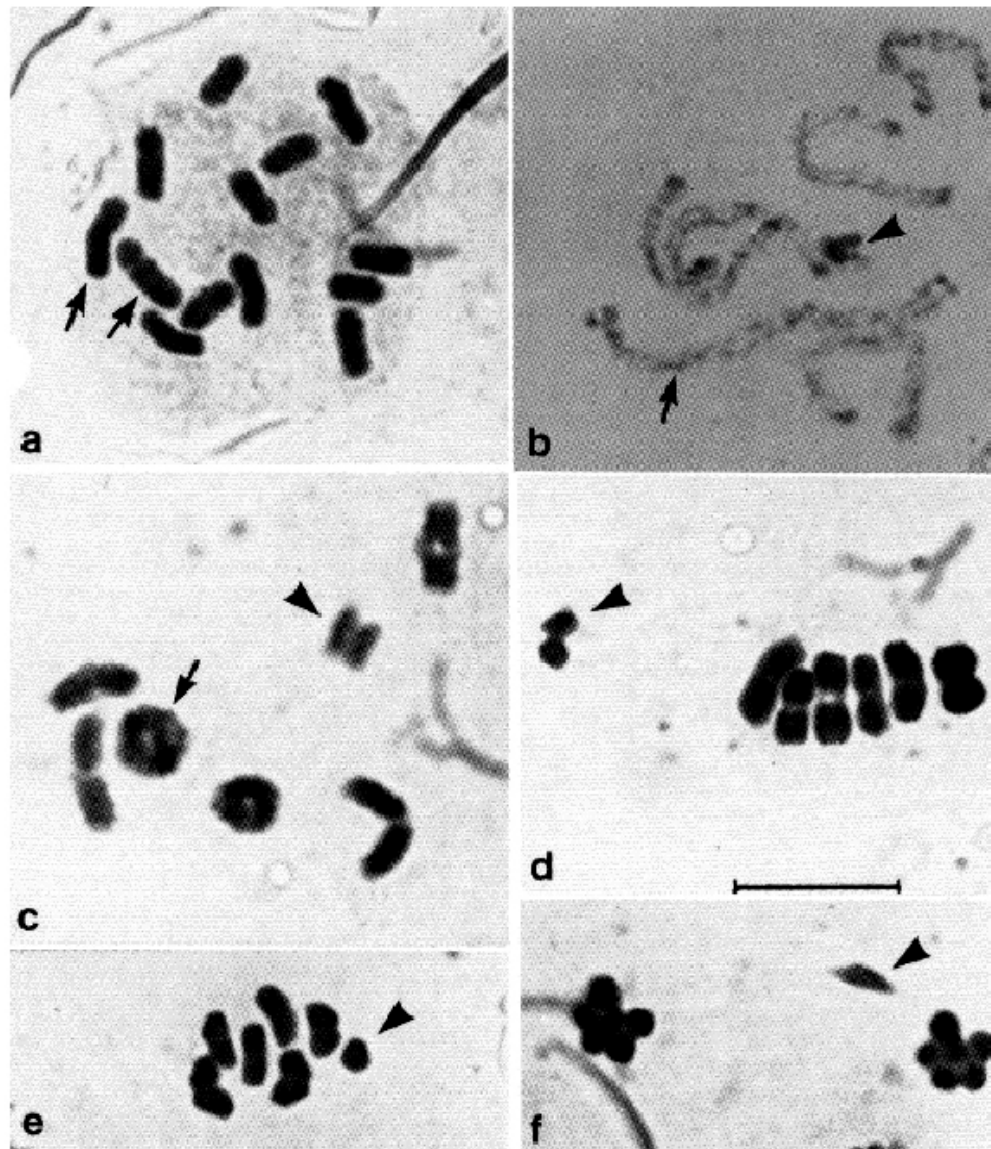
*Largus rufipennis* se caracteriza por poseer cromosomas de gran tamaño y un complemento cromosómico diploide  $2n = 13/14 = 12 + X0/12 + XX$ . Entre los bivalentes autosómicos se distingue un par marcadamente mayor, tres pares de tamaño mediano y dos pares menores, siendo el cromosoma sexual X el más pequeño del complemento (**Figura 9a-c**).

Desde la profase meiótica temprana, el cromosoma X es heteropicnótico positivo y se ubica en la periferia del núcleo. En paquitene se observa que el cromosoma X y un bivalente autosómico están asociados al nucléolo; en diacinesis, el univalente sexual se torna isopicnótico (**Figura 9c**). En ambas placas metafásicas los autosomas se disponen formando un anillo y el cromosoma X se ubica fuera de él (**Figura 9d, e**). En anafase I, los bivalentes autosómicos se dividen reduccionalmente y el univalente X lo hace ecuacionalmente; en anafase II el X se dirige hacia uno de los polos de manera rezagada respecto de los autosomas (**Figura 9f**). Como resultado, en telofase II se observan células con 7 ( $6A + X$ ) y 6 ( $6A$ ) cromosomas (**Figura 9f**).

En diacinesis-metafase I, los bivalentes autosómicos presentan uno o dos quiasmas en posición terminal (**Figura 9c**). Sin embargo, se observaron células con hasta cuatro bivalentes en anillo en muy baja frecuencia. La frecuencia media de quiasmas es diferente entre las distintas poblaciones estudiadas. En la población procedente de Itaembé, la frecuencia media de quiasmas en células en diacinesis-metafase I es de 6,62 (entre 6,86 y 6,25, especímenes I-1 y I-6, respectivamente) (**Tabla 7**). Por otro lado, en la población proveniente de Tornquist es de 6,28 (entre 6,58 y 6,05, especímenes T-1 y T-11, respectivamente) y en la población procedente de Costanera Norte es de 6,18 (entre 6,31 y 6,05, especímenes CN-1 y CNI-8/CN-9, respectivamente) (**Tabla 7**). La comparación de la frecuencia media de quiasmas de las tres poblaciones revela diferencias significativas ( $P < 0,01$ ); no obstante, las diferencias entre las poblaciones de Tornquist y Costanera Norte no son significativas ( $P > 0,05$ ) mientras que la frecuencia media de quiasmas en la población de Itaembé es significativamente más alta ( $P < 0,05$ ).

Cabe mencionar que se han observado células con un par de univalentes en individuos de las tres poblaciones. Todos los ejemplares de la población de Itaembé presentan una baja frecuencia de células con univalentes (0-2,4%), mientras que los ejemplares de Tornquist y Costanera Norte presentan una frecuencia de univalentes más variada (0,00-11,11% y 0,00-6,48%, respectivamente) (**Tabla 7**).





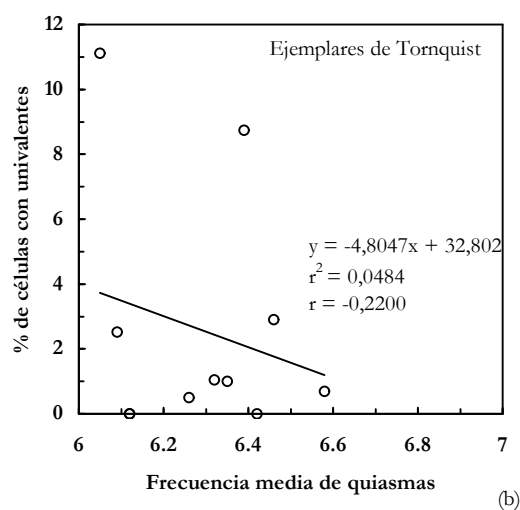
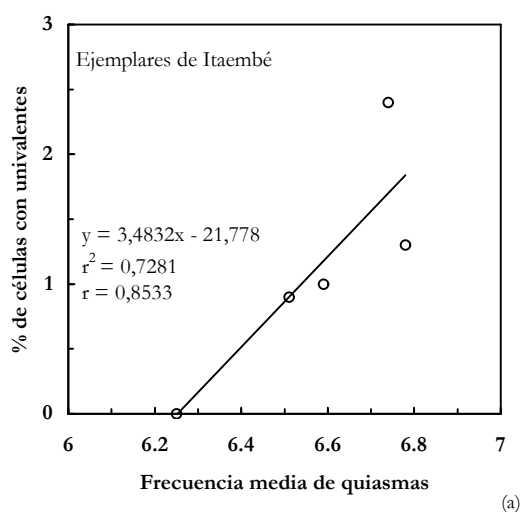
**Figura 9.** Meiosis en *Largus rufipennis* (cariotipo estándar). (a) Prometafase mitótica; (b) Paquitene tardío; (c) Diacinesis; (d) Metafase I; (e) Metafase II; (f) Telofase II. Cabezas de flecha negras: cromosoma sexual X; flechas negras: par cromosómico mayor. Barra= 10  $\mu$ m.

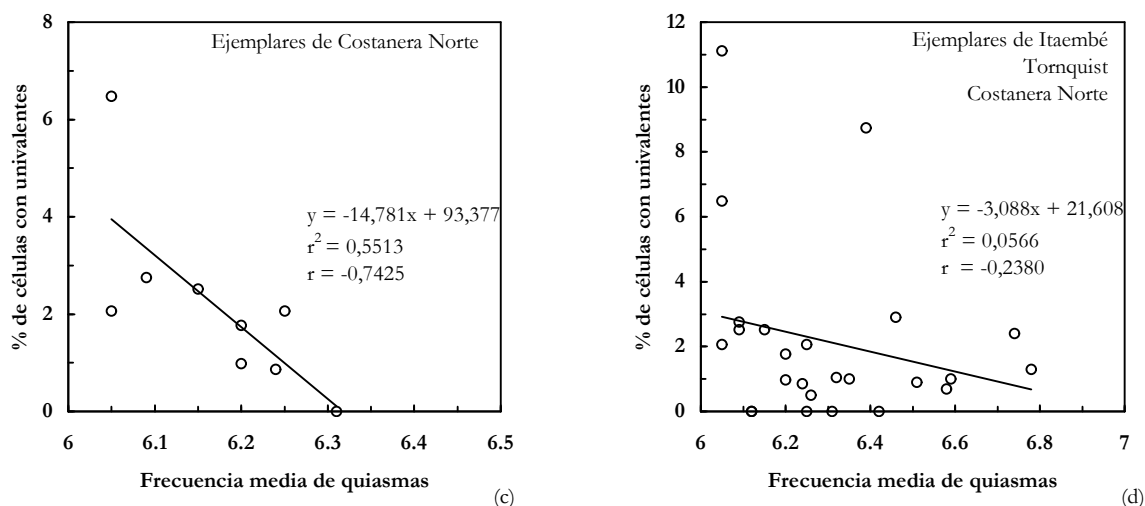
**Tabla 7.** Frecuencia media de quiasmas y porcentaje de células con univalentes en los individuos de las poblaciones procedentes de Itaembé, Tornquist y Costanera Norte

Procedencia	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I	Porcentaje de células con univalentes
Itaembé (Provincia de Misiones)	I-1	236	6,86	Ver Tabla 8
	I-2	233	6,78	1,3
	I-3	117	6,51	0,9
	I-4	101	6,59	1
	I-5	124	6,74	2,4
	I-6	89	6,25	0
Tornquist (Provincia de Buenos Aires) Tornquist (Provincia de Buenos Aires)	T-1	142	6,58	0,7
	T-2	103	6,46	2,91
	T-3	76	6,42	0,00
	T-4	183	6,39	8,74
	T-5	95	6,35	1,00
	T-6	95	6,32	1,05
	T-7	199	6,25	0,50
	T-8	51	6,12	0,00
	T-9	190	6,12	0,00
	T-10	278	6,09	2,52
	T-11	54	6,05	11,11
Costanera Norte (Ciudad Autónoma de Buenos Aires)	CN-1	117	6,31	0,00
	CN-2	97	6,25	2,06
	CN-3	116	6,24	0,86

	CN-4	113	6,20	1,77
	CN-5	102	6,20	0,98
Costanera Norte (Ciudad Autónoma de Buenos Aires)	CN-6	119	6,15	2,52
	CN-7	109	6,09	2,75
	CN-8	108	6,05	6,48
	CN-9	39	6,05	2,06

Sobre la base del análisis de regresión realizado respecto de la formación de univalentes (**Figura 10a-d**), se concluye que la población procedente de Misiones muestra una correlación positiva y prácticamente significativa ( $r = 0,8533$ ) considerando el bajo número de ejemplares analizados ( $N = 5$ ) (**Figura 10a**). En los especímenes de la población proveniente de Tornquist, la correlación es negativa pero no significativa, dado que el bajo valor de  $r$  ( $r = -0,220$ ) indica que prácticamente no existe correlación entre el porcentaje de células con univalentes y la frecuencia media de quiasmas (**Figura 10b**). En los individuos de la población procedente de Costanera Norte, la correlación es negativa y significativa ( $r = -0,7425$ ) como esperaríamos de una dependencia exclusiva de la frecuencia media de quiasmas (**Figura 10c**). Las pendientes y ordenadas al origen son significativamente distintas. El análisis de regresión permite inferir que las tres poblaciones de *L. rufipennis* siguen dinámicas distintas respecto de la formación de univalentes.

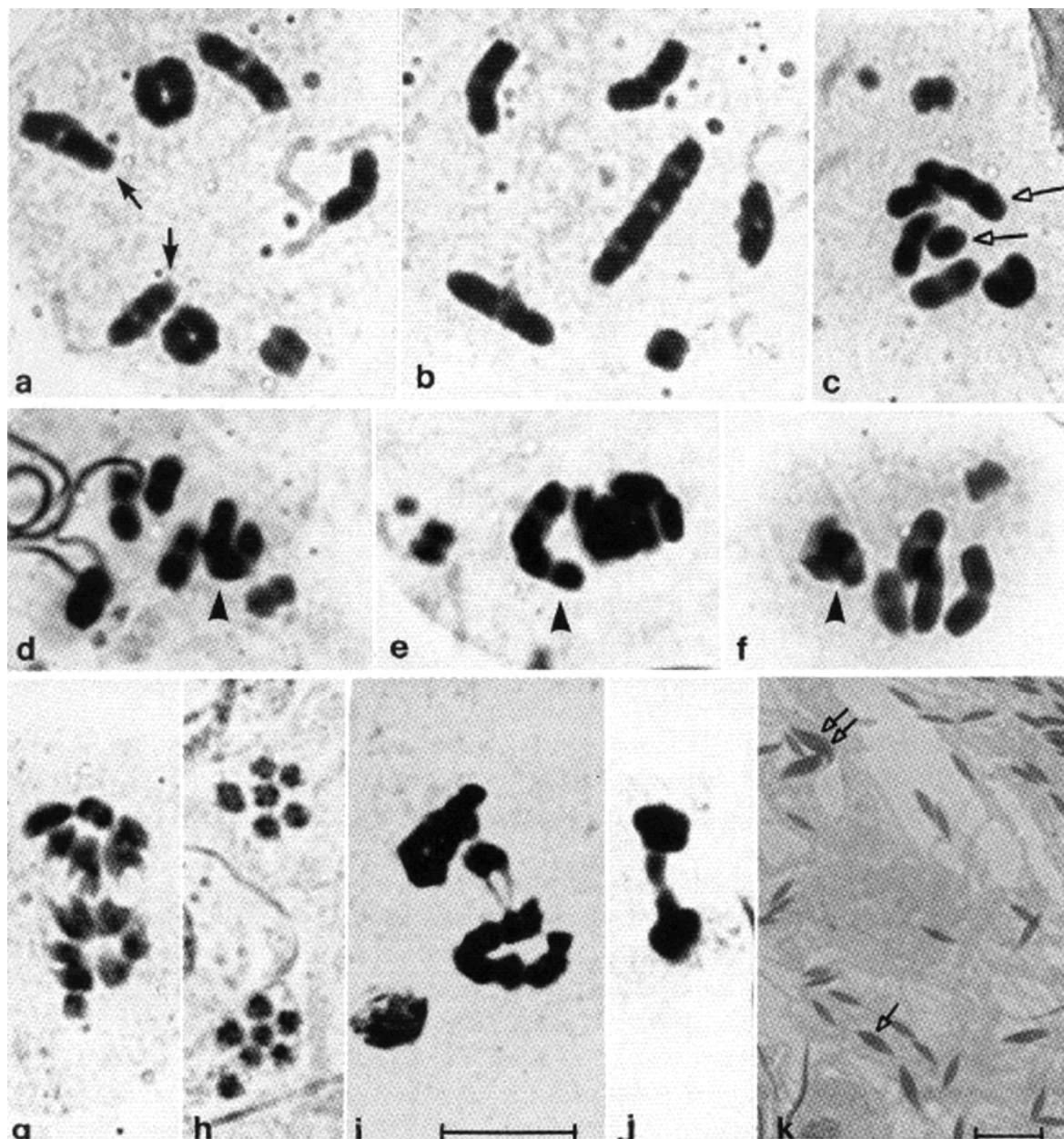




**Figura 10.** Análisis de regresión del porcentaje de células con univalentes en función de la frecuencia media de quiasmas en los ejemplares de *Largus rufipennis* de (a) Itaembé, (b) Tornquist, (c) Costanera Norte y (d) conjunto de ejemplares de las tres poblaciones. En las rectas de regresión “y” representa el porcentaje de células con univalentes, “x” es la frecuencia media de quiasmas y r es el coeficiente de correlación de Pearson.

Un individuo de la muestra de Itaembé era heterocigota para una translocación recíproca desigual entre dos pares medianos de autosomas, observándose distintas configuraciones meióticas (**Tabla 8**). En diacinesis las configuraciones meióticas más frecuentes fueron: 6II+X (54,24%) (con dos bivalentes heteromórficos) y 1 IV+4 II+X (41,95%) (**Figura 11a, b**) (**Tabla 8**). Una única célula presentó 1 IV+3 II+2 I+X (0,42%) y en ocho células se observó 1 III+1 I+4 II+X (3,39%) (**Tabla 8**). En las células en diacinesis con la configuración meiótica 6 II+X, se distinguieron dos bivalentes heteromórficos de tamaño medio (**Figura 11a**); los restantes bivalentes eran homomórficos, presentaban uno o dos quiasmas y nunca se observaron como univalentes. Asimismo, en las células en diacinesis con la configuración meiótica 1 IV+4 II+X (44 células), el cuadrivalente (IV) siempre se presentó como una cadena lineal, mientras que la configuración en anillo nunca fue observada (**Figura 11b**). La disposición de los cuatro cromosomas en el IV lineal siempre fue la misma: un cromosoma pequeño, uno de tamaño mediano, uno de tamaño más grande y otro mediano (**Figura 11b**). En metafase I el IV se orientó predominantemente en forma adyacente adoptando una configuración en “U” (56,36%) o en “C” (34,55%) en 56 células de un total de 132; la orientación alternada fue mucho menos frecuente (7,27%) y en una única célula se observó la disposición lineal (1,82%) (**Figura 11d-f**). La frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I en este individuo es de 6,86, siendo la frecuencia media de quiasmas más alta de todos los individuos analizados (**Tabla 7**).





**Figura 11.** Meiosis en el individuo de *Largus rufipennis*, heterocigota para la translocación recíproca. (a) Diacinesis con 6 bivalentes más el cromosoma X, flechas negras señalan a los dos heteromórficos; (b) Diacinesis con 1IV + 4II + X; (c) Metafase I con 1III + 1I + 4II + X, flechas vacías señalan el trivalente y el univalente; (d-f) Metafase I, el IV con orientación adyacente adoptando la forma en U (d), o la forma en C (e), o muestra una orientación alternada (f), cabezas de flecha negra señalan el cuádrivalente; (g) Anafase I; (h) Telofase II; (i) Anafase I, con rezagados; (j) Anafase II, con cromosomas rezagados; (k) espermátidas normales, macroespermátidas tipo I (flecha vacía) y tipo II (doble flecha vacía). Barra= 10  $\mu$ m.

**Tabla 8.** Configuraciones meióticas en el individuo de *Largus rufipennis* heterocigota para la translocación recíproca

Configuración meiótica	Número de quiasmas	Total de células en diacinesis-metafase I	Porcentaje de células
	6	77	
6 II+X (dos de ellos heteromórficos)	7	47	54,24
	8	4	
	7	59	
1 IV+4 II+X	8	38	41,95
	9	2	
1 IV+3 II+2 I+X	7	1	0,42
	6	2	
1 III+1 I+4 II+X	7	6	3,39
Total		236	

En 32% de células en anafase I-telofase I se observaron cromosomas rezagados (**Figura 11i**) (**Tabla 9**). La mayoría de las células en metafase II tenían 6 A+X, aunque se observaron algunos núcleos de restitución y algunas células aneuploides con 8 y 6 cromosomas. Asimismo, se detectaron células con cromosomas rezagados en anafase II-telofase II (**Figura 11j**).

Basándose en su tamaño podían distinguirse tres tipos de espermatidas: de tamaño normal; macroespermátidas tipo I, que son más grandes que las espermatidas normales y probablemente sean diploides producto de bloqueos citocinéticos en meiosis I; y macroespermátidas tipo II, cuyo tamaño es dos veces el de las tipo I y posiblemente sean tetraploides como consecuencia de dos bloqueos en meiosis I y II (**Figura 11k**).

**Tabla 9.** Número de células normales y anormales en el individuo de *Largus rufipennis* heterocigota para la translocación recíproca

Estadio meiótico	Total de células normales	Total de células anormales	Porcentaje de células anormales
Anafase I-Telofase I	21	10	32
Metafase II	40	(a) 6	12
		(b) 3	6
		(c) 1	2
Anafase II-Telofase II	5	3	37,5
Espermátidas	984	(d) 50	4,8
		(e) 17	1,6

(a) Núcleo de restitución; (b) metafase II con 8 cromosomas (uno en exceso); (c) metafase II con 6 cromosomas; (d) macroespermátidas tipo I; (e) macroespermátidas tipo II

## 11. Familia Lygaeidae

### 11.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Lygaeus alboornatus* Blanchard, 1852

*Lygaeus alboornatus* se caracteriza por poseer un complemento cromosómico diploide  $2n=12$  (10+XY/XX). Un par autosómico se distingue claramente de los restantes cuatro pares de autosomas debido a su gran tamaño, mientras que el cromosoma Y es el más pequeño del complemento (**Figura 12A**).

En cigotene, los cromosomas sexuales X e Y son heteropicnóticos positivos y se ubican próximos entre sí, pero en paquitene están usualmente separados (**Figura 12B**). Durante el estadio difuso los bivalentes autosómicos se descondensan completamente, mientras que los cromosomas sexuales permanecen heteropicnóticos positivos y pueden estar separados o próximos uno de otro (**Figura 12C**). En diplotene-diacinesis los cromosomas X e Y son isopicnóticos y siempre se encuentran separados (**Figura 12D-F**). En diacinesis tardía, el cromosoma Y se torna heteropicnótico negativo. En metafase I, ambos cromosomas sexuales se orientan lado a lado y se ubican en el centro del anillo formado por los cinco bivalentes autosómicos (**Figura 12G**). En anafase I, los bivalentes autosómicos segregan reduccionalmente, mientras que los cromosomas X e Y se dividen ecuacionalmente. En metafase II, los autosomas se disponen nuevamente formando un anillo, mientras que los cromosomas sexuales X e Y se

aproximan y se asocian para formar un pseudobivalente (pII), el cual se ubica en el centro del anillo (**Figura 12H**). En anafase II, el X y el Y migran sincrónicamente a polos opuestos.

Los bivalentes autosómicos generalmente presentan un único quiasma terminal; sin embargo, el bivalente mayor y, menos frecuentemente, otros bivalentes pueden presentar dos quiasmas (**Figura 12G**) (**Tabla 10**). Asimismo, se observaron algunas células con dos bivalentes en anillo. La frecuencia media de quiasmas en células en diacinesis-metafase I es de 5,67, variando entre 5,3 y 6,2 (especímenes PPT-1 y PPT-3, respectivamente) (**Tabla 10**).

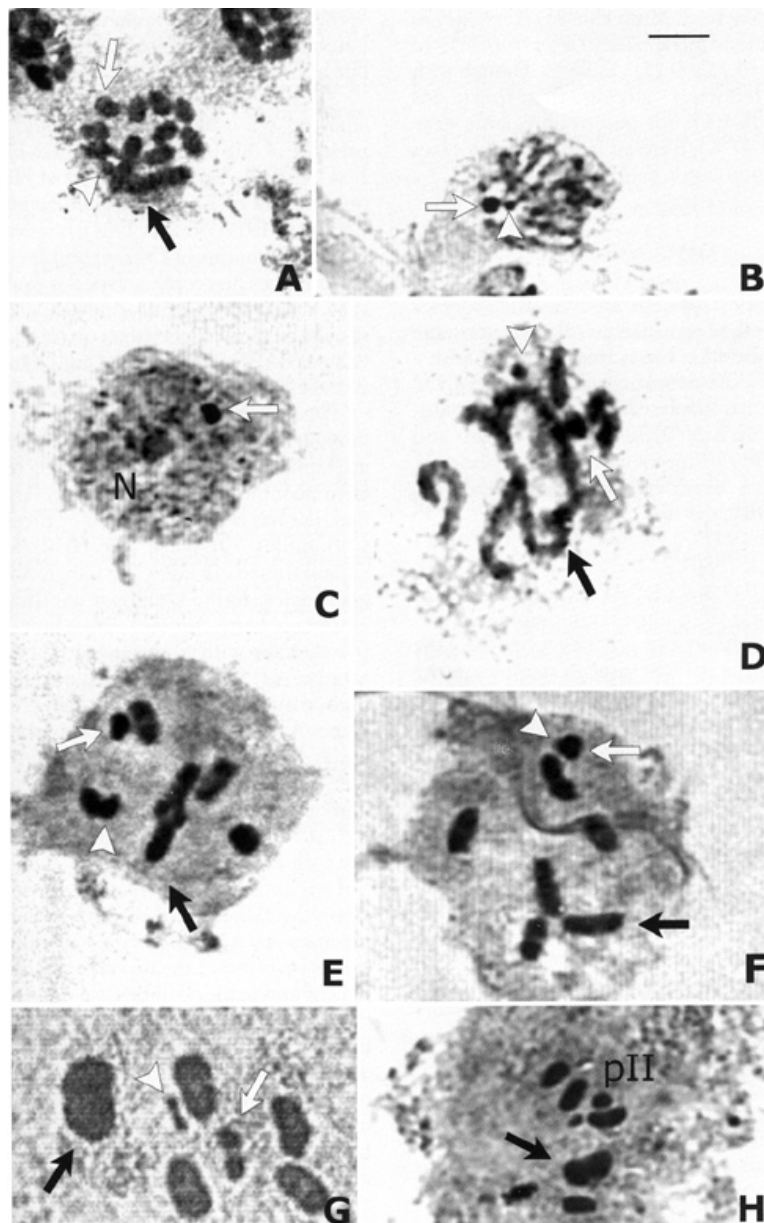
En la **Figura 13** se muestra la distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células en diacinesis-metafase I de los especímenes estudiados. Esta figura revela que aunque 6 es el número de quiasmas más frecuente por célula, 87% de las células presentó un número de quiasmas entre 5 y 6 (**Figura 13**).

**Tabla 10.** Frecuencia media de quiasmas y porcentaje de células con univalentes en diacinesis-metafase I en *Lygaeus alboornatus*

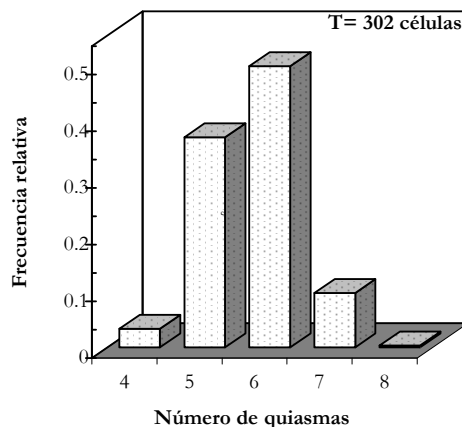
Procedencia	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I <sup>(a)</sup>	Porcentaje de células con univalentes
Parque Provincial E. Tornquist (Provincia de Buenos Aires)	PPT-1	5	6,2 ± 1,2 (S= 0,8367/Φ= 4)	nd
	PPT-2	35	6,0 ± 0,3 (S= 0,7276/Φ= 34)	14,29
	PPT-3	43	5,3 ± 0,2 (S= 0,5990/Φ= 42)	9,52
	PPT-4	20	5,7 ± 0,3 (S= 0,6569/Φ= 19)	5,00
	PPT-5	23	5,8 ± 0,3 (S= 0,5997/Φ= 22)	0,00
	PPT-6	64	5,6 ± 0,2 (S= 0,6547/Φ= 63)	9,37
	PPT-7	46	5,6 ± 0,2 (S= 0,7989/Φ= 45)	15,22
	PPT-8	46	5,6 ± 0,2 (S= 0,7447/Φ= 45)	6,52
	PPT-9	25	6,0 ± 0,3 (S= 0,6110/Φ= 24)	0,00

<sup>(a)</sup>, los límites fiduciales corresponden a la distribución *t* de Student para un nivel de confianza de 95%, con Φ grados de libertad; nd, porcentaje de células con univalentes no determinada debido al número reducido de células analizadas



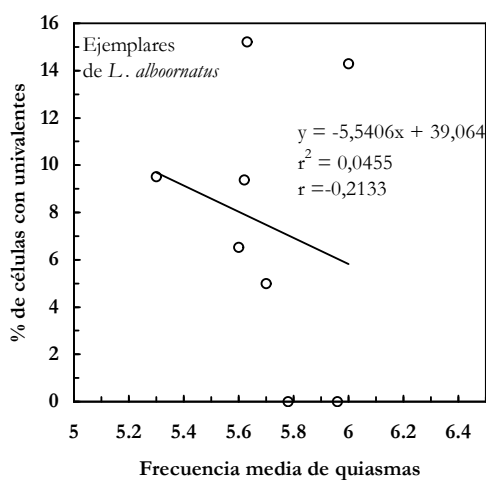


**Figura 12.** Meiosis en *Lygaeus alboornatus*. (A) Prometáfase mitótica; (B) Paquitene; (C) Estadio difuso; (D) Diplotene; (E) Diacinesis, flecha negra señala al bivalente mayor con un quiasma intersticial; (F) Diacinesis, flecha negra señala al bivalente mayor con un quiasma terminal; (G) Metafase I, flecha negra señala al bivalente mayor con dos quiasmas; (H) Metafase II. Flechas blancas: cromosoma sexual X; cabezas de flecha blancas: cromosoma sexual Y; N: nucléolo; pII: pseudobivalente. Barra= 10  $\mu$ m.



**Figura 13.** Distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células analizadas en diacinesis-metafase I *Lygaeus alboornatus*. En el histograma la frecuencia relativa se grafica en función del número de quiasmas observados en todas las células en diacinesis-metafase I. La frecuencia relativa se calculó como el número de células que presentan un determinado número de quiasmas dividido el número total de células analizadas (T).

Por otro lado, sólo en seis individuos analizados se observaron células con un par de univalentes con una frecuencia variable y en la mayoría de los casos derivados del par autosómico mayor (57,69%). En relación con la formación de univalentes, del análisis de regresión se concluye que la población analizada muestra una correlación negativa y no significativa ( $r = -0,2133$ ) (**Figura 14**). Por tal motivo, no se puede sacar una conclusión respecto de la dependencia del porcentaje de células con univalentes con la frecuencia media de quiasmas.



**Figura 14.** Análisis de regresión del porcentaje de células con univalentes en función de la frecuencia media de quiasmas en los ejemplares de *Lygaeus alboornatus* procedentes de Tornquist. En las rectas de regresión “y” representa el porcentaje de células con univalentes, “x” es la frecuencia media de quiasmas y r es el coeficiente de correlación de Pearson.

## 12. Familia Pyrrhocoridae

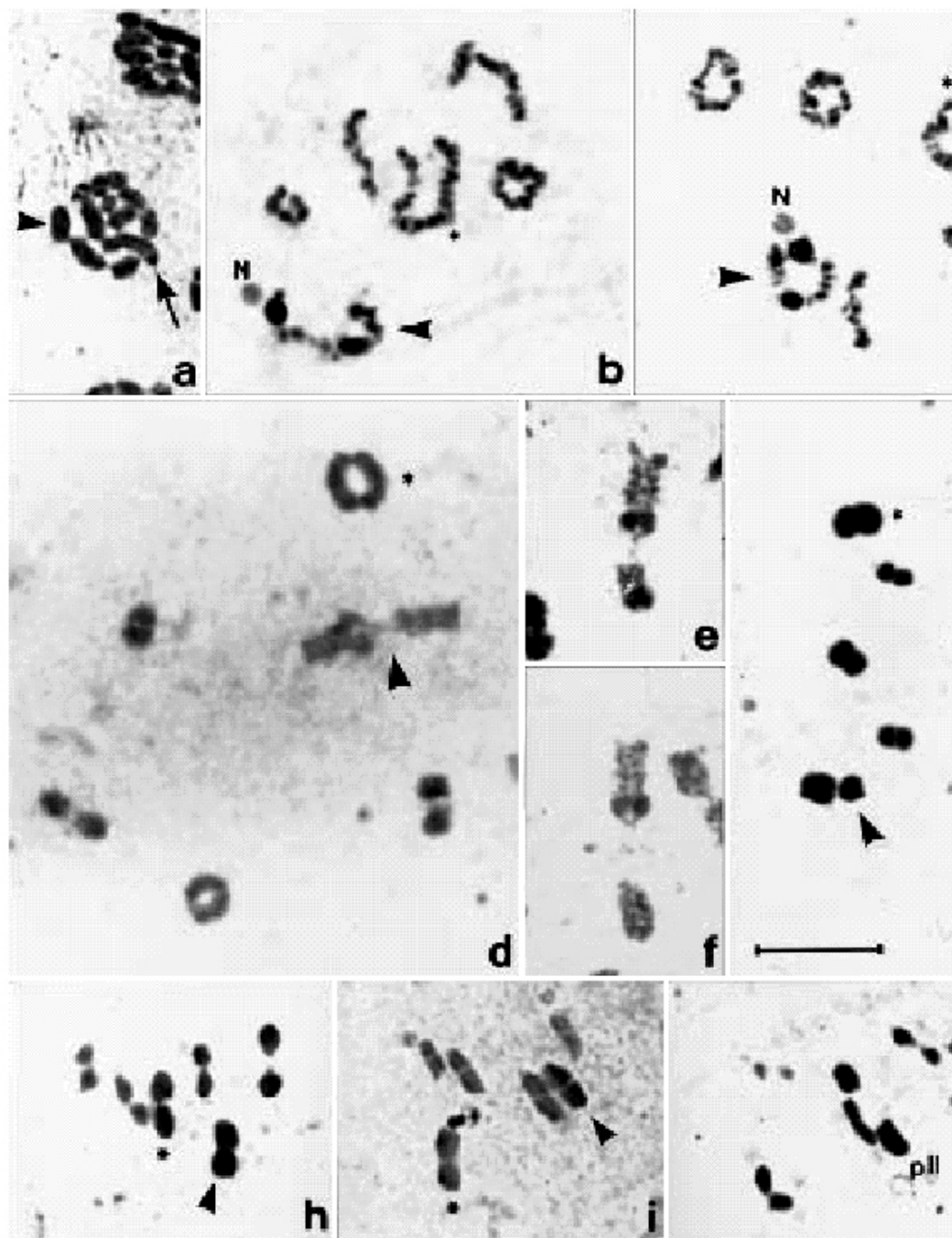
### 12.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Dysdercus albofasciatus* Berg, 1878 (PUBLICACION II)

Todos los especímenes analizados de *Dysdercus albofasciatus* poseen un número cromosómico diploide  $2n = 12 = 10 + \text{neoXY} / 10 + \text{neoXX}$ , entre los cuales se distinguen un par autosómico mayor, dos pares medianos y dos pares pequeños.

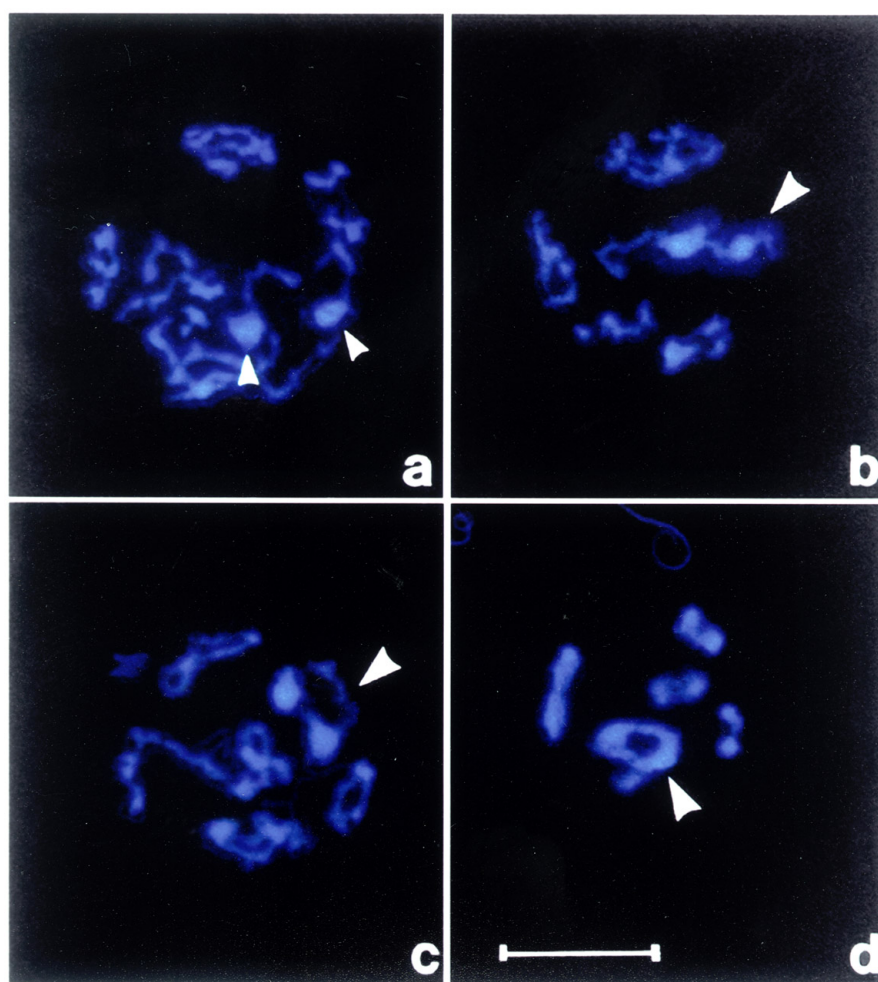
En prometafase mitótica se identifica al neoX porque es el cromosoma más grande, mientras que el neoY es ligeramente más grande que los autosomas de tamaño mediano (**Figura 15a**). Los núcleos en paquitene son difíciles de analizar debido a que no es posible individualizar los bivalentes autosómicos. Sin embargo, dos segmentos heteropicnóticos positivos de tamaño diferente son claramente visibles. A partir de diplotene, se distinguen cinco bivalentes autosómicos y el bivalente sexual neoXY heteromórfico (**Figura 15b, c**). En algunas células en diacinesis temprana los cromosomas sexuales aparecen asociados por una fina hebra de cromatina (**Figura 15e, f**); en diacinesis tardía, los segmentos subterminales heteropicnóticos positivos del neoX se tornan isopicnóticos. En metafase I tanto los bivalentes autosómicos como el bivalente neoXY muestran una orientación axial en el huso (**Figura 15g**). En anafase I todos los cromosomas migran sincrónicamente hacia los polos, dando como resultado dos tipos de metafases II, unas con 6 (5A+neoX) (**Figura 15h**) y otras con 6 (5A+neoY) cromosomas (**Figura 15i**). Por consiguiente, el bivalente sexual neoXY experimenta una meiosis pre-reduccional, es decir, se divide reduccionalmente en la primera división meiótica y presenta un comportamiento similar al de los autosomas.

El análisis citogenético mediante tinción con DAPI permite distinguir claramente los dos segmentos subterminales de tamaño diferente del neoX como elementos DAPI positivos durante la profase meiótica (**Figura 16a-d**).

Los bivalentes autosómicos generalmente presentan un solo quiasma, aunque el bivalente mayor, y con menor frecuencia el bivalente de tamaño mediano, pueden mostrar dos quiasmas terminales. El bivalente neoXY es el más grande del complemento y claramente heteromórfico, pudiendo presentar un quiasma y con menor frecuencia dos quiasmas en posición terminal (**Figura 15b-d**). En once especímenes procedentes del Parque Nacional El Palmar (81,2%) y en seis del Parque Nacional Iguazú (85,7%) el par neoXY estaba presente como univalentes en algunas células en diacinesis-metafase I. En anafase I este par de univalentes se dividía ecuacionalmente y en las metafases II resultantes los cromosomas sexuales se asociaban en un pseudobivalente (pII) (**Figura 15j**) (**Tabla 11**).



**Figura 15.** Meiosis en *Dysdercus albobfasciatus*. (a) Prometafase mitótica, flecha negra señala neo-X, cabeza de flecha negra neo-Y; (b, c) Diplotene tardío, el bivalente sexual presenta uno (b) o dos quiasmas (c); (d) Diacinesis temprana; (e, f) Bivalentes sexuales en diacinesis temprana; (g) Metafase I; (h-j) Metafase II con neo-X (h), con neo-Y (i) y con pseudobivalente (j). (b-d, g, h) Cabezas de flecha negras: cromosomas sexuales; asteriscos: autosoma mayor; N: nucléolo; pII: pseudobivalente. Barra= 10  $\mu$ m.



**Figura 16.** Meiosis en *Dysdercus albofasciatus* (con DAPI). (a) Diplotene temprano, cabezas de flecha blancas señalan los dos segmentos subterminales de tamaño diferente del neoX; (b, c) Diplotene; (d) Diacinesis temprana, en (b-d) cabezas de flecha blancas señalan al bivalente sexual neo-XY. Barra= 10  $\mu$ m.



**Tabla 11.** Configuraciones meióticas de los individuos de *Dysdercus albofasciatus* en diacinesis-metafase I y en metafase II

Procedencia	Individuo	Diacinesis-Metafase I			Total de células	Metafase II		Total de células
		6II	5II+2sexI	5II+2I		Sin pII	Con pII	
Parque Nacional El Palmar (Provincia de Entre Ríos)	PNEP-1	13	---	2	15	6	1	7
	PNEP-2	81	5	---	86	1	---	1
	PNEP-3*	37	5	1	43	11	1	12
	PNEP-4	11	2	---	13	---	---	---
	PNEP-5	27	2	1	30	11	1	12
	PNEP-6	15	3	1	19	---	---	---
	PNEP-7	4	1	---	5	4	1	5
	PNEP-8*	11	---	1	12	1	---	1
	PNEP-9	9	1	1	11	---	---	---
	PNEP-10	23	2	2	27	1	---	1
	PNEP-11	8	---	---	8	---	---	---
	PNEP-12	3	---	---	3	---	---	---
	PNEP-13*	11	6	1	18	6	1	7
	PNEP-14*	27	---	1	28	9	5	14
	PNEP-15	2	1	1	4	1	---	1
	PNEP-16	8	4	2	14	---	---	---
Parque Nacional Iguazú (Provincia de Misiones)	PNI-1	5	---	---	5	---	---	---
	PNI-2	81	23	5	109	---	---	---
	PNI-3	25	12	4	41	16	11	27
	PNI-4	84	35	1	120	44	5	49
	PNI-5	25	13	3	41	---	---	---
	PNI-6	17	11	---	28	3	5	8
	PNI-7	18	1	1	20	2	---	2

\*, cromosomas B en 90,9%, 85,6%, 60,0% y 26,2% de las células de los individuos 3, 8, 13, y 14, respectivamente

El complemento cromosómico fue corroborado en los especímenes procedentes de Gualeguaychú y de la Reserva Provincial isla Martín García. Sin embargo, el número de células disponibles para el análisis meiótico fue escaso, no pudiendo determinarse con certeza la presencia de univalentes.

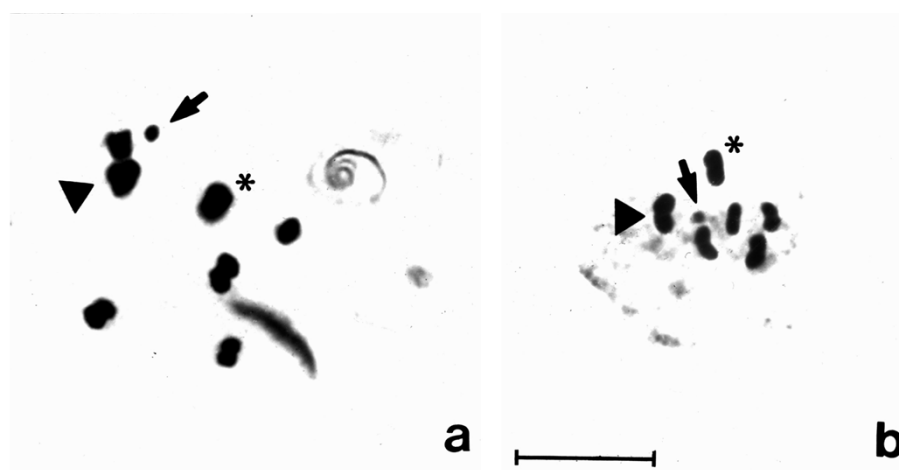
Asimismo, se observó un par autosómico como dos univalentes en once individuos procedentes del Parque Nacional El Palmar y en cinco del Parque Nacional Iguazú de ambas poblaciones (68,7% y 71,4% de los individuos, respectivamente) (**Tabla 11**).

En la población procedente del Parque Nacional El Palmar, en cuatro individuos (PNEP-3, PNPEP-8, PNEP-13 y PNEP-14) se observó la presencia de un cromosoma B en un porcentaje variado de células (entre 90,9% y 26,2%) (**Figura 17a, b**) (**Tabla 11**). Este cromosoma B se divide ecuacionalmente en anafase I y reduccionalmente en la segunda división meiótica, rezagándose con respecto a los autosomas.

## 12.2. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Dysdercus chaquensis* Freiberg, 1948 (PUBLICACION V)

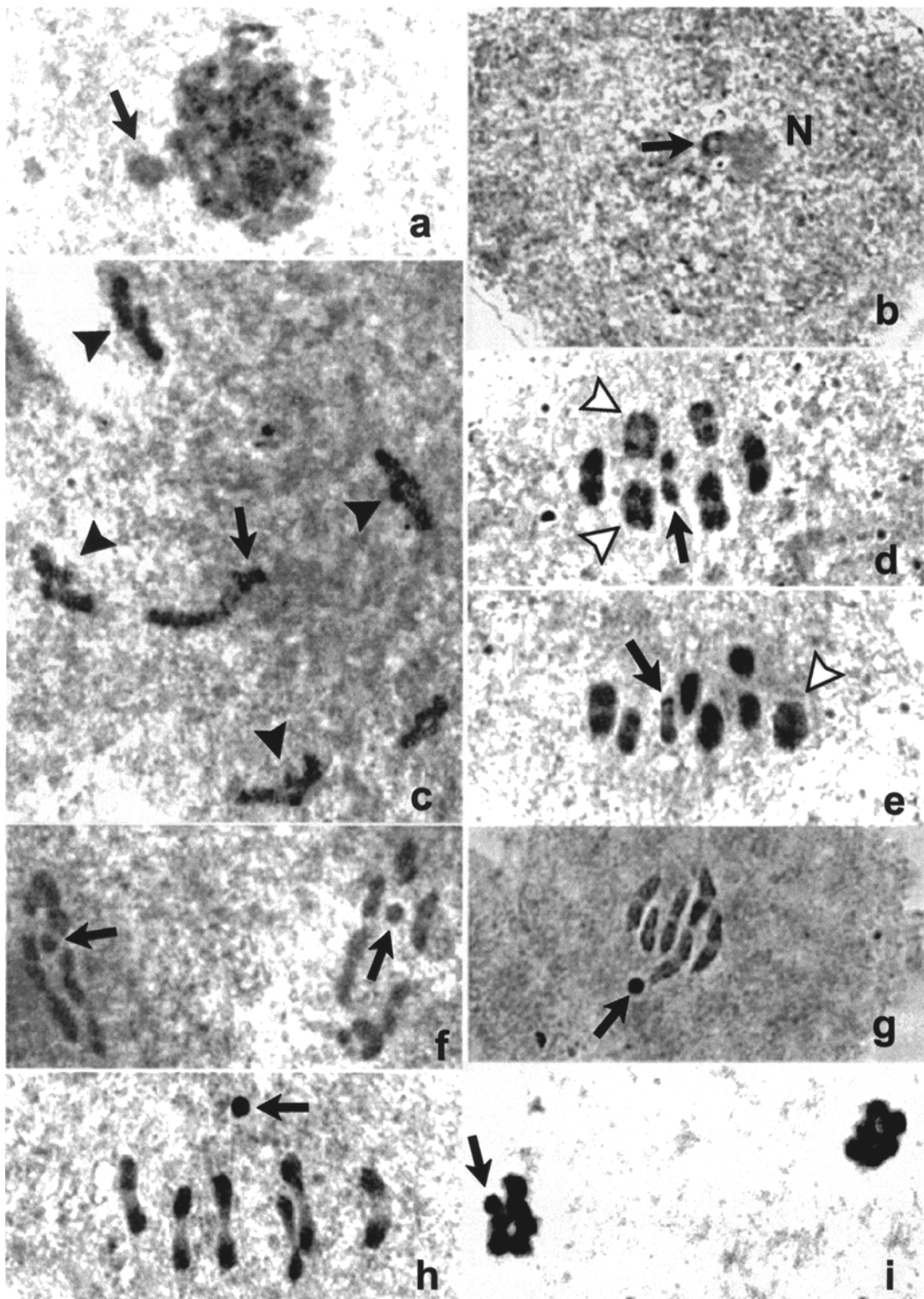
Todos los ejemplares analizados, pertenecientes a las poblaciones endocriada y natural, presentan un complemento cromosómico diploide  $2n = 13/14 = 12 + X0/12 + XX$ ; con dos pares de autosomas mayores, tres medianos y uno más pequeño, siendo el cromosoma sexual X de tamaño similar al par autosómico menor.

En leptotene-cigotene el cromosoma X es heteropicnótico positivo y se ubica en la periferia del núcleo (**Figura 18a**). A continuación del estadio de paquitene, se observó la presencia de un estadio difuso únicamente en los ejemplares de la población natural. Durante este estadio los bivalentes autosómicos se descondensan casi completamente, pudiendo observarse regiones heteropicnóticas positivas, mientras que el cromosoma X permanece condensado y asociado a un conspicuo nucléolo; la célula aumenta de tamaño y el núcleo adquiere una apariencia similar a la de interfase (**Figura 18b**). Del total de células meióticas analizadas, el porcentaje de células en estadio difuso en los individuos salvajes varía entre 10,36% y 73,73%. A partir de diplotene, es posible identificar a los seis bivalentes autosómicos y al univalente X. En diacinesis tardía el cromosoma sexual se torna isopicnótico (**Figura 18c**); en metafase I los bivalentes autosómicos se disponen en el plano ecuatorial adoptando una configuración en anillo y el X se ubica en su centro (**Figura 18d, e**). En anafase I los bivalentes autosómicos segregan reduccionalmente, mientras que el X se divide ecuacionalmente.



**Figura 17.** Meiosis en *Dysdercus albofasciatus*. (a) Prometáfase I, flecha negra señala el cromosoma B; (b) Metafase II, flecha negra señala el cromosoma B. Cabezas de flecha negras: bivalente sexual neo-XY. Barra= 10  $\mu$ m.

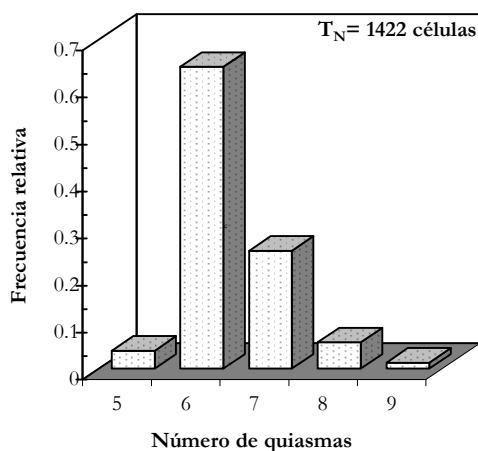




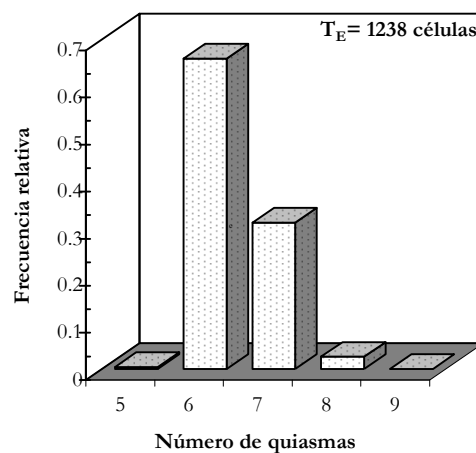
**Figura 18.** Meiosis de ejemplares de la población natural de *Dysdercus chaquensis*. (a) Leptotene; (b) Estadio difuso; (c) Diacinesis, cabezas de flecha negras señalan a los bivalentes autosómicos con quiasmas intersticiales; (d, e) Metafase I, flechas blancas señalan a los bivalentes mayores con dos quiasmas; (f) Telofase I; (g) Metafase II; (h) Anafase II; (i) Telofase II. Flechas negras: cromosoma sexual X; N: nucléolo. Barra= 10  $\mu$ m.

Los núcleos en telofase I conservan la disposición observada en metafase I (**Figura 18f**) y ésta se mantiene hasta metafase II (**Figura 18g**). En anafase II el cromosoma X migra precozmente hacia uno de los polos (**Figura 18h**), descondensándose tardíamente en telofase II (**Figura 18i**).

Los bivalentes autosómicos presentan generalmente un único quiasma terminal, aunque un bivalente mayor y, menos frecuentemente, otros bivalentes pueden presentar dos quiasmas (**Figura 18d, e**). Asimismo, en una muy baja frecuencia se observaron células con dos bivalentes en anillo. La frecuencia media de quiasmas en células en diacinesis-metafase I varía entre 6,0 y 6,9 en la población natural y entre 6,1 y 6,5 en la población endocriada (**Tabla 12**). La **Figura 19** muestra la distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células en diacinesis-metafase I de los especímenes de las poblaciones natural y endocriada. En esta figura se observa que el número de quiasmas más frecuente es 6 por célula (64% y 66% de las células de los especímenes naturales y endocriados, respectivamente) (**Figura 19**).



(a)



(b)

**Figura 19.** Distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células analizadas en diacinesis-metafase I en los ejemplares de la (a) población natural y (b) endocriada de *Dysdercus chaquensis*. En el histograma la frecuencia relativa se grafica en función del número de quiasmas observados en todas las células en diacinesis-metafase I.

**Tabla 12.** Frecuencia media de quiasmas, porcentaje de células con univalentes en diacinesis-metafase I y porcentaje de células en estadio difuso en las poblaciones natural y endocriada de *Dysdercus chaquensis*

Población	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I <sup>(a)</sup>	Porcentaje de células con univalentes	Porcentaje de células en estadio difuso <sup>(b)</sup>
Natural	N-1	9	6,1±0,5 (S= 0,6009/Φ= 8)	11,11	25,00
	N-2	21	6,6±0,3 (S= 0,6690/Φ= 20)	0,00	37,13
	N-3	11	6,0±0,3 (S= 0,4472/Φ= 10)	18,18	30,00
	N-4	14	6,4±0,4 (S= 0,7559/Φ= 13)	0,00	65,07
	N-5	27	6,3±0,2 (S= 0,5547/Φ= 26)	0,00	48,17
	N-6	8	6,2±0,4 (S= 0,4629/Φ= 7)	0,00	10,36
	N-7	10	6,1±0,4 (S= 0,5676/Φ= 9)	20,00	16,00
	N-8	---	nd	nd	73,73
	N-9	60	6,0±0,1 (S= 0,3667/Φ= 59)	5,00	48,93
	N-10	12	6,2±0,4 (S= 0,5774/Φ= 11)	8,33	39,39
	N-11	11	6,6±0,6 (S= 0,9244/Φ= 10)	0,00	40,91
	N-12	---	nd	nd	40,21
	N-13	14	6,9±0,3 (S= 0,4746/Φ= 13)	0,00	21,63
	N-14	16	6,5±0,4 (S= 0,7432/Φ= 15)	6,25	39,91
	N-15	6	6,7±0,9 (S= 0,8165/Φ= 5)	nd	38,66
	N-16	6	7±1 (S= 1,2111/Φ= 5)	nd	29,12
Endocriada	E-1	18	6,1±0,2 (S= 0,3416/Φ= 17)	0,00	---
	E-2	72	6,4±0,1 (S= 0,5388/Φ= 71)	2,78	---
	E-3	14	6,3±0,3 (S= 0,4688/Φ= 13)	0,00	---
	E-4	14	6,1±0,2 (S= 0,3631/Φ= 13)	0,00	---

	E-5	---	nd	nd	---
	E-6	38	$6,4 \pm 0,2$ ( $S = 0,5929/\Phi = 37$ )	2,63	---
	E-7	---	nd	nd	---
Endocriada	E-8	---	nd	nd	---
	E-9	---	nd	nd	---
	E-10	22	$6,5 \pm 0,3$ ( $S = 0,5982/\Phi = 21$ )	0,00	---
	E-11	18	$6,2 \pm 0,2$ ( $S = 0,4031/\Phi = 17$ )	0,00	---

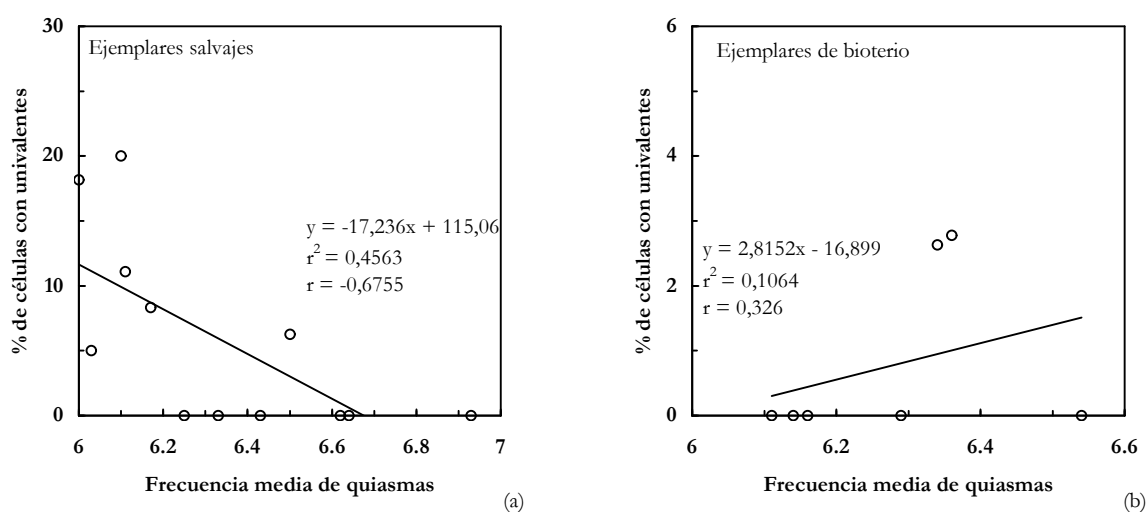
<sup>(a)</sup>, los límites fiduciales corresponden a la distribución *t* de Student para un nivel de confianza de 95%, con  $\Phi$  grados de libertad; nd, porcentaje de células con univalentes no determinada debido al número reducido de células analizadas; <sup>(b)</sup>, con respecto a todas las células meióticas presentes en los testículos.

A los fines de evaluar si las frecuencias media de quiasmas son estadísticamente iguales para todos los individuos dentro de cada población y entre ambas poblaciones se realizó un análisis de varianza de dos factores. Este análisis reveló que no existen diferencias significativas entre la frecuencia media de quiasmas entre los individuos de cada población, ni entre las poblaciones natural y endocriada ( $F_1 = 0,026$  y  $F_2 = 0,012$ ). Dado los valores de  $F_1$  y  $F_2$  calculados, no se rechaza la hipótesis nula.

Del total de especímenes analizados procedentes de la población natural, sólo siete presentaron una meiosis regular; en seis individuos se observaron células con un par de univalentes, mientras que en los tres restantes la presencia/ausencia de univalentes no fue determinado debido al número reducido de células analizadas.

Con respecto a los especímenes de la población endocriada, solamente cinco tuvieron una meiosis regular, mientras que en dos individuos se observaron células con un par de univalentes en una frecuencia variada. En el resto de los ejemplares, la presencia de univalentes no pudo ser determinada debido al número reducido de células analizadas o a la ausencia de actividad meiótica en los testículos. Por otra parte, si bien en ambas poblaciones se observaron células con un par de univalentes en una muy baja frecuencia, el porcentaje de células con univalentes es tres veces y media más alto en los individuos salvajes (desde 5,00% hasta 20,00%) que en los individuos endocriados (desde 2,63% hasta 2,78%) (**Tabla 12**). En la mayoría de los casos un par autosómico mediano se ve involucrado en su formación (28,57% y 100% especímenes naturales y endocriados, respectivamente).

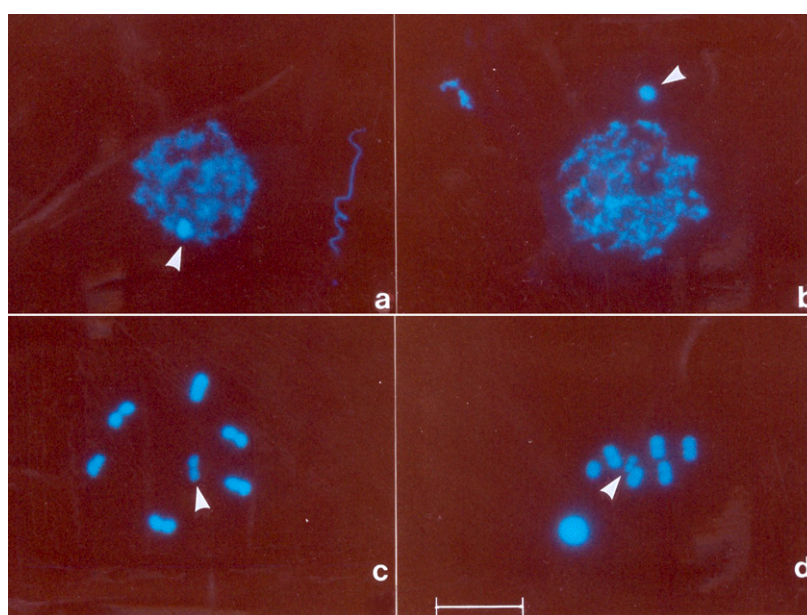
Sobre la base del análisis de regresión realizado respecto de la formación de univalentes (**Figura 20**), se concluye que los ejemplares de la población natural muestran una correlación negativa y moderadamente significativa ( $r = -0.6755$ ), como esperaríamos de una dependencia exclusiva de la frecuencia media de quiasmas (**Figura 20a**). En los especímenes de la población endocriada la correlación es positiva y no significativa, dado que el bajo valor de  $r$  ( $r = 0,326$ ) indica que no existe correlación entre el porcentaje de células con univalentes y la frecuencia media de quiasmas (**Figura 20b**). Las pendientes y ordenadas al origen tienen distinto signo. El análisis de regresión permite inferir que las dos poblaciones de *Dysdercus chaquensis* siguen dinámicas distintas respecto de la formación de univalentes.



**Figura 20.** Análisis de regresión del porcentaje de células con univalentes en función de la frecuencia media de quiasmas en los ejemplares de *Dysdercus chaquensis* de: (a) población natural y (b) población de bioterio. En las rectas de regresión "y" representa el porcentaje de células con univalentes, "x" es la frecuencia media de quiasmas y  $r$  es el coeficiente de correlación de Pearson.

El análisis citogenético mediante tinción con DAPI muestra resultados concordantes para ambas poblaciones de *D. chaquensis* estudiadas (**Figura 21b, d**). En profase temprana, al cromosoma X se lo distingue claramente de los bivalentes autosómicos como un elemento DAPI positivo, debido a su grado de condensación, al igual que en el estadio difuso de los ejemplares de la población natural (**Figura 21b**). En diacinesis todos los cromosomas presentan una fluorescencia homogénea al igual que en metafase I (**Figura 21d**). Cabe señalar que no se observaron bandas DAPI positivas en los bivalentes autosómicos ni en el cromosoma X.





**Figura 21.** Meiosis de *Dysdercus chaquensis* (ejemplares naturales) (**a, c**) y *Dysdercus ruficollis* (**b, d**) (con DAPI). (**a, b**) Leptotene; (**c, d**) Metafase I. Cabezas de flecha blancas: cromosoma sexual X. Barra= 10  $\mu\text{m}$ .

### 12.3. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico en *Dysdercus ruficollis* (Linnaeus, 1764)

Esta especie se caracteriza citogenéticamente por poseer un complemento cromosómico diploide  $2n = 13/14 = 12+X0/12+XX$ . En el cariotipo meiótico entre los II autosómicos se distinguen dos mayores, dos medianos y dos más chicos, siendo el cromosoma sexual X de tamaño similar a uno de los más pequeños del complemento (**Figura 22e**).

El apareamiento de los cromosomas homólogos ocurre en sinicinesis (**Figura 22a**). Desde paquitene hasta diplotene el cromosoma X es heteropicnótico positivo (**Figura 22b-d**), tornándose isopicnótico en diacinesis (**Figura 22e**) y heteropicnótico negativo en metafase I. Los bivalentes autosómicos se disponen formando un anillo en metafase I y el univalente sexual X se ubica en su centro, migrando sincrónicamente con dichos bivalentes en anafase I.

En la primera división meiótica el cromosoma X se divide ecuacionalmente, mientras que los bivalentes lo hacen reduccionalmente. En metafase II el cromosoma sexual se ubica fuera de la placa ecuatorial y migra precozmente en anafase II (**Figura 22f**). Los núcleos telofásicos presentan 7 (6A+X) y 6 (6A) cromosomas (**Figura 22g**).

En el análisis citogenético con tinción con DAPI se observa que durante la profase meiótica temprana el cromosoma X es DAPI positivo debido a su grado de condensación (**Figura 21a**); en diacinesis y en metafase I todos los cromosomas presentan una fluorescencia homogénea (**Figura 21c**). Además, no se observaron bandas DAPI positivas en los bivalentes autosómicos ni en el cromosoma X.

Los bivalentes autosómicos suelen presentar un quiasma de posición subterminal o terminal durante diplotene-diacinesis temprana (**Figura 22d**) y, por lo general, un solo quiasma terminal en diacinesis-metafase I (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I en *Dysdercus ruficollis*

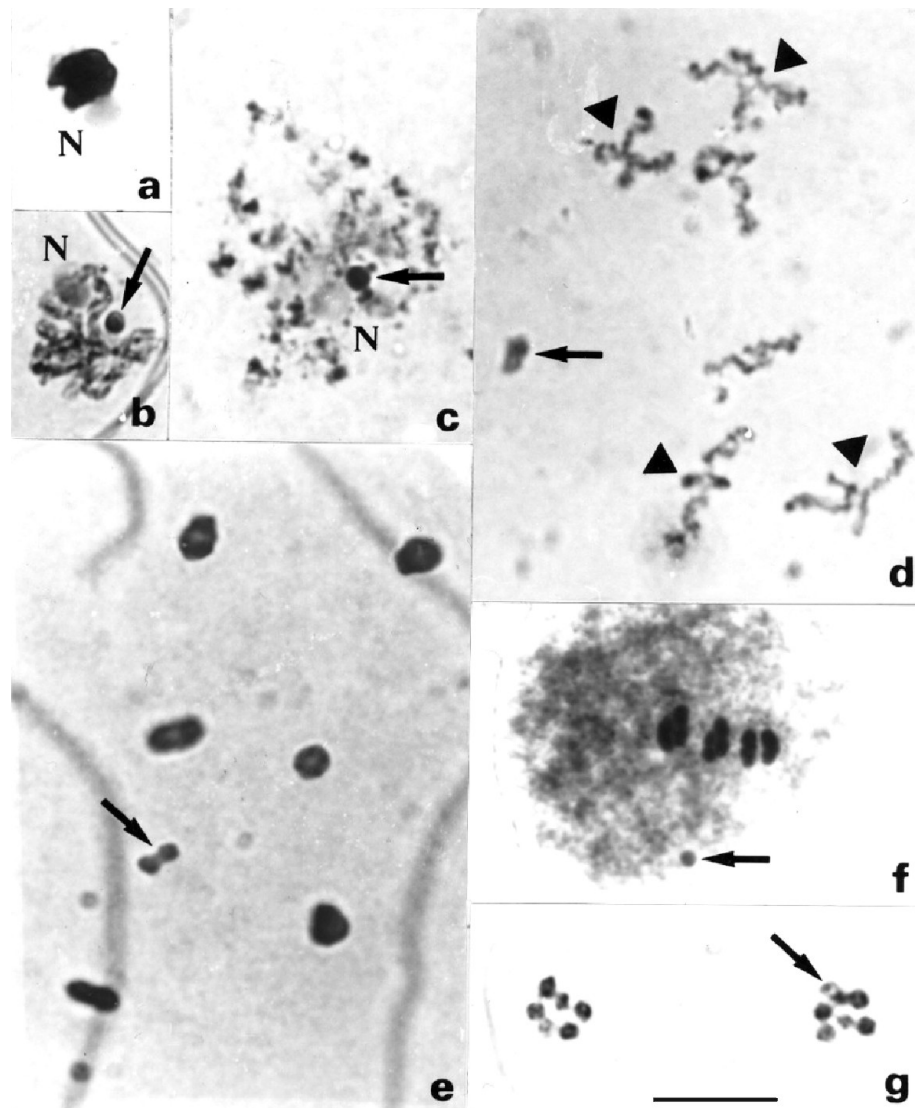
Procedencia	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I <sup>(a)</sup>
Arroyo Itaembé (Provincia de Misiones)	AI-1	17	6,2±0,3 (S= 0,5286/Φ= 16)
	AI-2	0	nd
	AI-3	16	6,8±0,5 (S= 0,8342/Φ= 15)
	AI-4	10	6,00 (S= 0/Φ= 9)
	AI-5	3	7±2 (S= 0,5744/Φ= 2)

	IMG-1	22	6,00 (S= 0/ $\Phi$ = 21)
	IMG-2	16	6,00 (S= 0/ $\Phi$ = 15)
	IMG-3	6	6,2 $\pm$ 0,5 (S= 0,4082/ $\Phi$ = 5)
	IMG-4	20	6,3 $\pm$ 0,2 (S= 0,4472/ $\Phi$ = 19)
	IMG-5	9	6,00 (S= 0/ $\Phi$ = 8)
	IMG-6	13	6,00 (S= 0/ $\Phi$ = 12)
	IMG-7	7	5,9 $\pm$ 0,5 (S= 0,5/ $\Phi$ = 6)
	IMG-8	33	6,2 $\pm$ 0,2 (S= 0,5453/ $\Phi$ = 32)
	IMG-9	4	6,00 (S= 0/ $\Phi$ = 3)
Reserva Provincial Isla Martín García (Provincia de Buenos Aires)	IMG-10	5	6,4 $\pm$ 0,8 (S= 0,5477/ $\Phi$ = 4)
	IMG-11	13	6,9 $\pm$ 0,6 (S= 0,9541/ $\Phi$ = 12)
	IMG-12	30	6,2 $\pm$ 0,1 (S= 0,3790/ $\Phi$ = 29)
	IMG-13	9	6,6 $\pm$ 0,7 (S= 0,8819/ $\Phi$ = 8)
	IMG-14	4	6,00 (S= 0/ $\Phi$ = 3)
	IMG-15	8	6,4 $\pm$ 0,7 (S= 0,7440/ $\Phi$ = 7)
	IMG-16	7	7,1 $\pm$ 0,7 (S= 0,6901/ $\Phi$ = 8)
	IMG-17	3	6,3 $\pm$ 1,8 (S= 0,5774/ $\Phi$ = 2)
	IMG-18	6	7,3 $\pm$ 0,6 (S= 0,5164/ $\Phi$ = 5)
	IMG-19	6	6,00 (S= 0/ $\Phi$ = 5)
	IMG-20	12	6,6 $\pm$ 0,3 (S= 0,5149/ $\Phi$ = 11)

<sup>a)</sup>, los límites fiduciales corresponden a la distribución *t* de Student para un nivel de confianza de 95%, con  $\Phi$  grados de libertad; nd, no determinado debido a que sólo espermátidas fueron encontradas en los testículos

A los fines de evaluar si las frecuencias medias de quiasmas son estadísticamente iguales para todos los individuos dentro de cada población y entre ambas poblaciones, hipótesis nula, se realizó un análisis de varianza de dos factores. Este análisis reveló que no existen diferencias significativas entre la frecuencia media de quiasmas entre los individuos de cada población, ni entre las poblaciones procedentes de Itaembé (provincia de Misiones) e isla Martín García (provincia de Buenos Aires) ( $F_1$ = 0,046 y  $F_2$ = 0,014). Dado los valores de  $F_1$  y  $F_2$  calculados, no se rechaza la hipótesis nula.





**Figura 22.** Meiosis en *Dysdercus ruficollis*. (a) Sinicesis; (b) Paquitene; (c) Estadio difuso; (d) Diplotene, cabezas de flecha negras señalan a los bivalentes autosómicos con quiasmas intersticiales; (e) Diacinesis tardía; (f) Metafase II; (g) Telofase II. Flechas negras: cromosoma sexual X; N: nucléolo. Barra= 10  $\mu$ m.

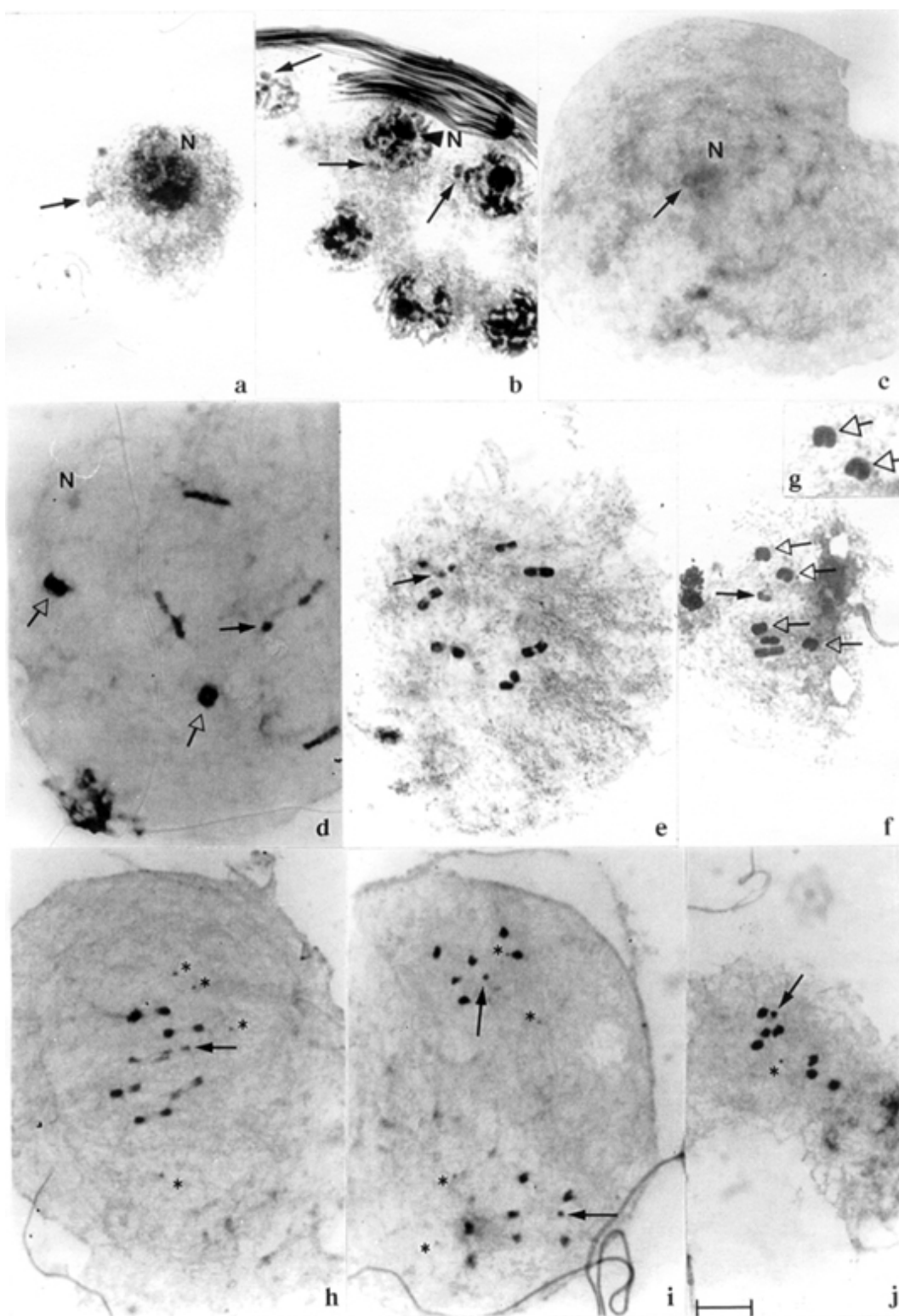
#### 12.4. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Dysdercus imitator* Blöte, 1931

*Dysdercus imitator* posee un complemento cromosómico diploide  $2n = 13/14 = 12 + X0/12 + XX$ . Durante la profase meiótica temprana, el cromosoma sexual X es heteropicnótico positivo y se localiza en la periferia del núcleo, separado de la cromatina autosómica (**Figura 23a**). El apareamiento cromosómico tiene lugar en sinicesis, y en paquitene tanto el univalente X como un conspicuo nucléolo se distinguen claramente (**Figura 23b**).

Durante el estadio difuso, la célula comienza a aumentar de tamaño y el núcleo adquiere una apariencia similar a la de una célula interfásica. Los bivalentes autosómicos se descondensen completamente mientras que el cromosoma X permanece condensado (**Figura 23c**). En diplotene y diacinesis los bivalentes autosómicos se vuelven a condensar (**Figura 23d**). En metafase I los bivalentes autosómicos se disponen en anillo y el cromosoma X se ubica en el centro o fuera de él (**Figura 23e, f**). Durante este estadio, se distinguen tres bivalentes autosómicos mayores, dos medianos y uno menor, siendo el X el más pequeño del complemento (**Figura 23e**). En anafase I los bivalentes autosómicos segregan reduccionalmente, mientras que el X se divide ecuacionalmente y de manera sincrónica con los autosomas (**Figura 23h-j**). En metafase II los cromosomas adoptan una disposición similar a la descrita para metafase I y en anafase II el cromosoma X segrega sincrónicamente con los autosomas.

Los bivalentes autosómicos suelen presentar un quiasma terminal; sin embargo, se observaron hasta cinco bivalentes en anillo (**Figura 23d, f, g**). La frecuencia media de quiasmas en células en diacinesis-metafase I varía entre 6,10 y 8,72 (individuos PNI-9 y PNI-6, respectivamente, **Tabla 14**).

La **Figura 24** muestra la distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células en diacinesis-metafase I de los once especímenes estudiados. La frecuencia relativa se calculó como el número de células que presentan un determinado número de quiasmas (entre 5 y 11) dividido el número total de células analizadas ( $T = 290$ ). De esta figura se desprende que, aunque el número de quiasmas más frecuente es 6 por célula, 70% de las células presentó un número de quiasmas entre 7 y 10. De esta manera, el valor de la media de la población total de células es de 7 quiasmas por células (**Figura 24**).

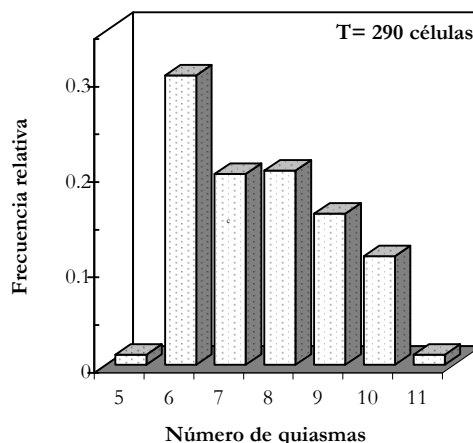


**Figura 23.** Meiosis de *Dysdercus imitator*. (a) Leptotene; (b) Paquitene; (c) Estadio difuso; (d) Diacinesis temprana; (e, f) Metafase I; (g) Bivalentes autosómicos con dos quiasmas en metafase I; (h) Anafase I; (i) Telofase I; (j) Prometafase II. Flechas negras: cromosoma sexual X; flechas vacías: bivalentes autosómicos con dos quiasmas; asteriscos: cuerpos prenucleolares; N= nucléolo. Barra= 10  $\mu$ m.

**Tabla 14.** Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I en *Dysdercus imitator*

Procedencia	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I <sup>(a)</sup>
Parque Nacional Iguazú (Provincia de Misiones)	PNI-1	21	7,3±0,5 (S= 1,1464/Φ= 20)
	PNI-2	15	7,9±0,8 (S= 1,4573/Φ= 14)
	PNI-3	0	nd
	PNI-4	17	7,4±0,7 (S= 1,2719/Φ= 16)
	PNI-5	61	8,6±0,3 (S= 1,3312/Φ= 60)
	PNI-6	29	8,7±0,4 (S= 0,9963/Φ= 28)
	PNI-7	1	nd
	PNI-8	1	nd
	PNI-9	10	6,1±0,4 (S= 0,5676/Φ= 9)
	PNI-10	5	8,2±1,2 (S= 0,8367/Φ= 4)
	PNI-11	14	7,4±0,8 (S= 1,2157/Φ= 13)
	PNI-12	31	7,7±0,5 (S= 1,4421/Φ= 30)
	PNI-13	6	7,8±1,4 (S= 1,2111/Φ= 5)
	PNI-14	79	6,5±0,2 (S= 0,8145/Φ= 78)
	PNI-15	0	nd
	PNI-16	0	nd

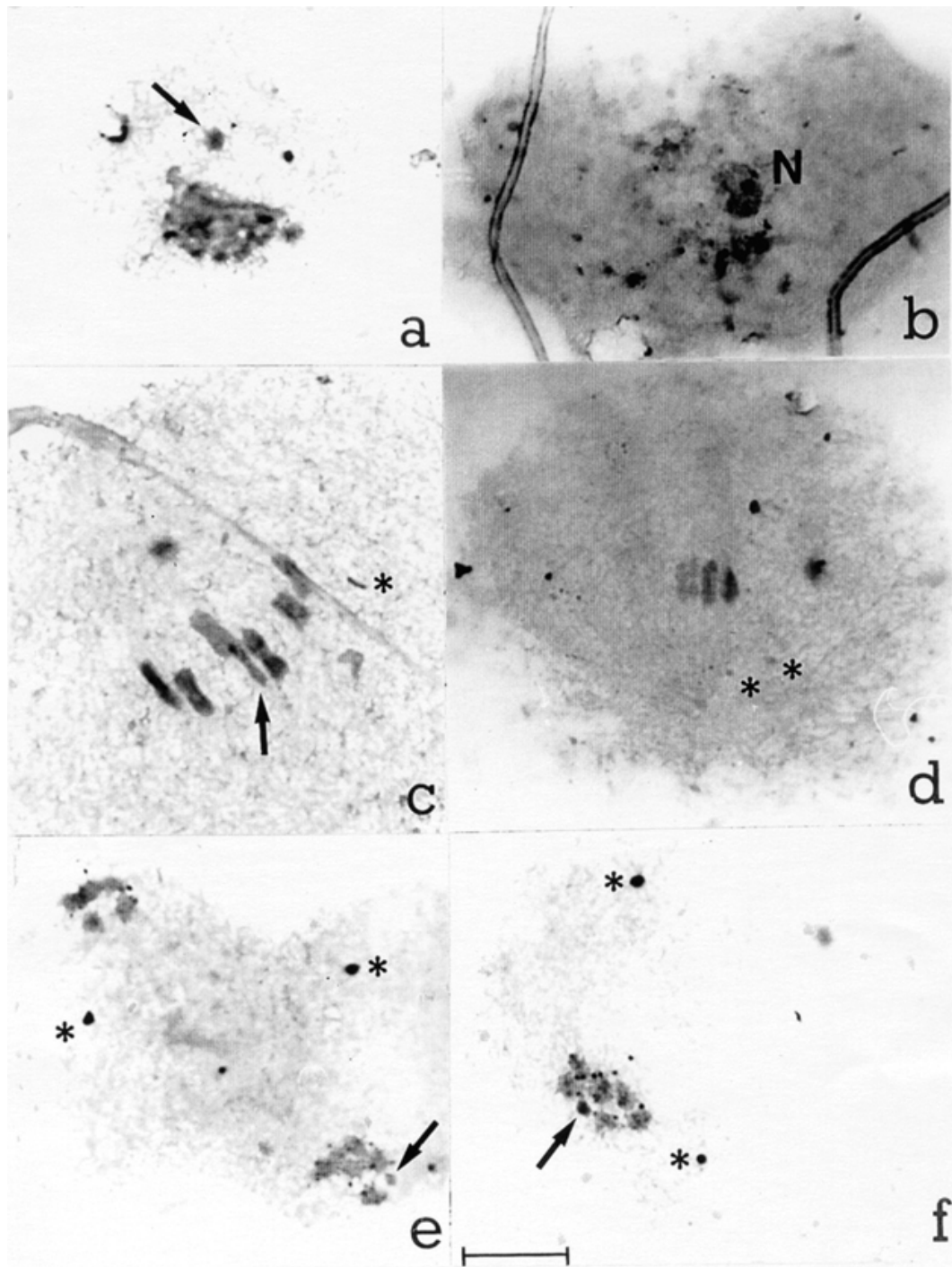
<sup>(a)</sup>, los límites fiduciales corresponden a la distribución *t* de Student para un nivel de confianza de 95%, con Φ grados de libertad; nd, no determinado debido a que sólo espermátidas fueron encontradas en los testículos



**Figura 24.** Distribución de la frecuencia relativa de quiasmas entre todas las células analizadas en diacinesis-metafase I de *Dysdercus imitator*. En el histograma la frecuencia relativa se grafica en función del número de quiasmas observados en todas las células en diacinesis-metafase I. La frecuencia relativa se calculó como el número de células que presentan un determinado número de quiasmas dividido el número total de células analizadas (T).

A los fines de evaluar si las frecuencias medias de quiasmas son estadísticamente iguales para todos los individuos analizados de *D. imitator*, hipótesis nula, se realizó un análisis de varianza. El valor calculado de la varianza entre individuos resultó igual a 22,31 y el de la varianza dentro de cada individuo resultó 1,31, siendo  $F = 16,99$ . Dado que el valor de F obtenido de tablas con  $p=0.05$  con 10 y 277 grados de libertad es mayor que el valor de F calculado debe rechazarse la hipótesis nula.

Por otra parte, durante la meiosis se detectaron varios elementos heteropicnóticos positivos, que diferían en número y tamaño. Desde leptotene hasta el estadio difuso se observa un conspicuo nucléolo inmerso en la cromatina autosómica; en algunas células se observan dos nucléolos de tamaño diferente (**Figura 25a, b**). A partir de diplotene generalmente se detectan los dos nucléolos; el mayor usualmente asociado a un bivalente autosómico mientras que el menor no muestra una ubicación definida. A medida que la meiosis prosigue, los dos nucléolos desaparecen y en su lugar se observan desde uno hasta cuatro cuerpos prenucleolares de diferente tamaño dispersos en el citoplasma (**Figura 25c-f**). En metafase I los cuerpos prenucleolares generalmente se ubican entre los cromosomas en el plano ecuatorial (**Figura 25c**), mientras que en metafase II y anafase II se localizan próximos a los polos (**Figura 25d**). En telofase II el cromosoma X se descondensa tardíamente y se observa un número menor de cuerpos prenucleolares de tamaño más grande (**Figura 25e, f**).



**Figura 25.** Meiosis de *Dysdercus imitator* (con  $\text{NO}_3\text{Ag}$ ). (a) Leptotene; (b) Estadio difuso; (c) Metafase I; (d) Metafase II; (e) Telofase II; (f) Núcleo telofásico. Flechas negras: cromosoma sexual X; asteriscos: cuerpos prenucleolares; N: nucléolo. Barra= 10  $\mu\text{m}$ .



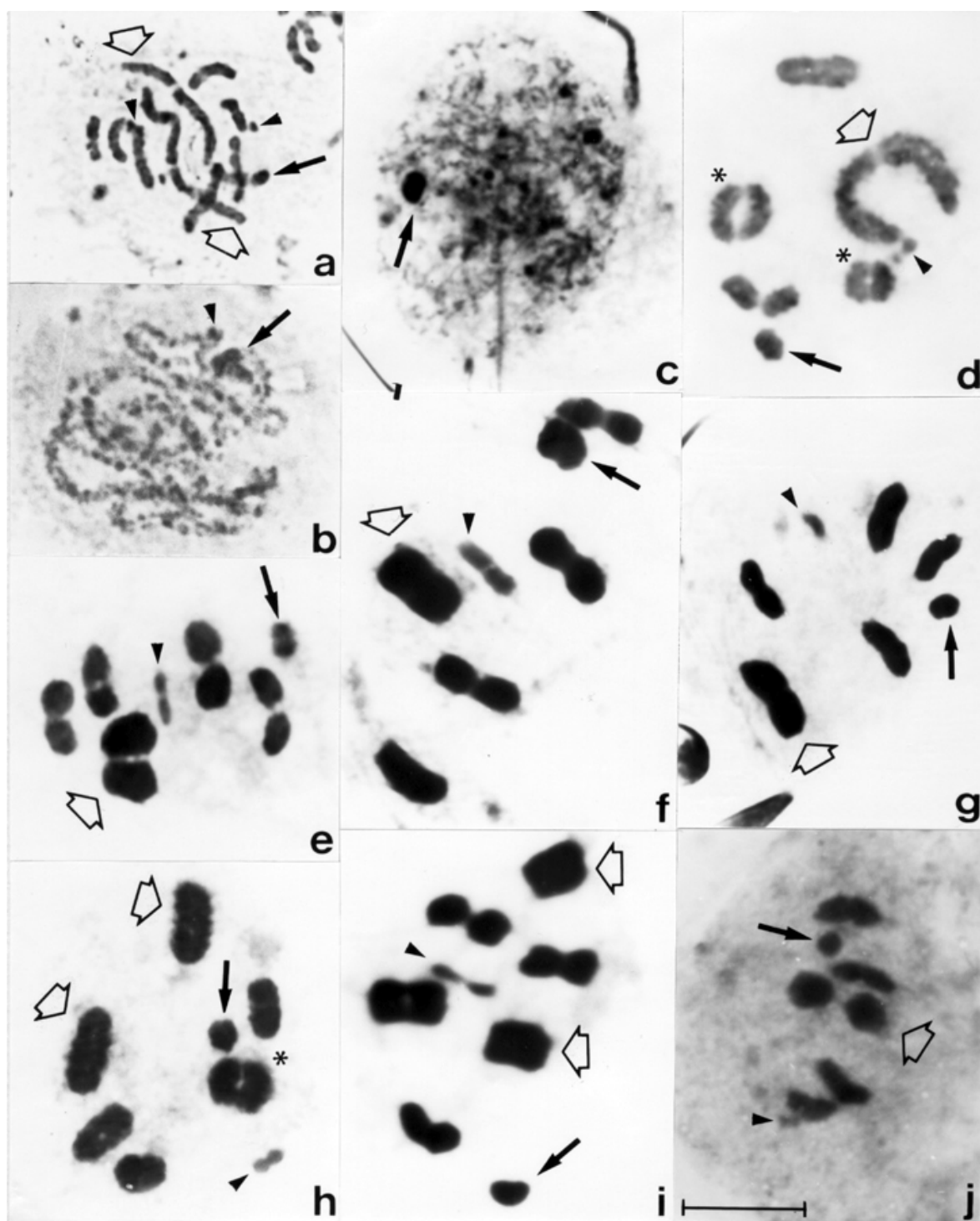
### 13. Familia Rhopalidae

#### 13.1. Complemento cromosómico y desarrollo meiótico de *Jadera haematoloma* (Herrich-Schaeffer, 1847) y *Jadera sanguinolenta* (Fabricius, 1775) (PUBLICACION IV)

Ambas especies presentan un cariotipo y un desarrollo meiótico similar. *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* poseen un número cromosómico diploide  $2n = 13/14 = 10 + 2m + X0/10 + 2m + XX$ , con un par autosómico fácilmente distinguible debido a su gran tamaño. El par de cromosomas *m* es diminuto y el cromosoma sexual X es de tamaño pequeño (**Figura 26a**).

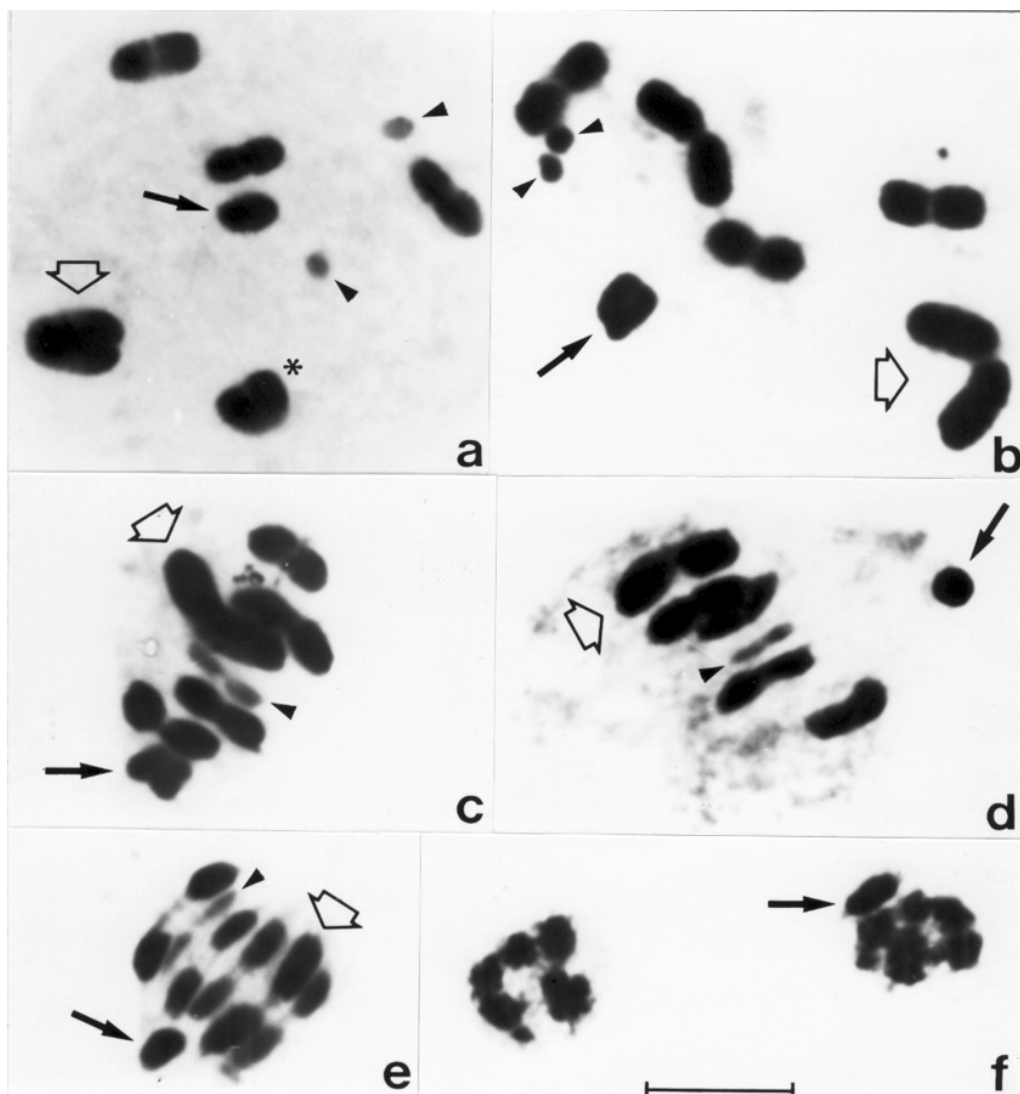
Desde leptotene-cigotene hasta el estadio difuso, el cromosoma X es heteropicnótico positivo y se localiza en la periferia del núcleo (**Figura 26b, c**). En paquitene los bivalentes autosómicos muestran una disposición en "bouquet", ubicándose en su base el par de cromosomas *m* aquíasmático y el cromosoma sexual (**Figura 26b**). Durante el estadio difuso los bivalentes autosómicos se descondensan completamente, mientras que el cromosoma X permanece heteropicnótico positivo (**Figura 26c**). En diplotene los cromosomas *m* continúan separados como univalentes, y a partir de diplotene tardío los *m* son heteropicnóticos negativos. En diacinesis los cromosomas *m* se aproximan y se asocian para formar un pseudobivalente (**Figura 26e; 27a,b**). En metafase I, el pseudobivalente *m* se orienta axialmente y se ubica en el centro del anillo formado por los bivalentes autosómicos y el univalente X (**Figura 26e, f, i; 27c**). En anafase I los bivalentes autosómicos, al igual que el pseudobivalente *m*, se dividen reduccionalmente, mientras que el cromosoma sexual se divide ecuacionalmente. En metafase II los autosomas se disponen en la placa ecuatorial formando un anillo y el X siempre se ubica fuera de éste (**Figura 27d**). El cromosoma *m* no muestra una posición definida y se puede ubicar tanto en el centro del anillo como formando parte de él (**Figura 27d**). En anafase II el cromosoma X migra precozmente hacia uno de los polos (**Figura 27e**) y se descondensa tardíamente en telofase II (**Figura 27f**).

En la mayoría de los individuos el univalente X es más pequeño que el bivalente autosómico menor (**Figura 26e, h; 27a**). Sin embargo, en ambas especies el cromosoma X muestra un polimorfismo de tamaño. En un espécimen de *Jadera haematoloma* (IMG-4, **Tabla 15**) y en tres ejemplares de *J. sanguinolenta* (IMG-8, IMG-9 y G-7, **Tabla 15**), el univalente sexual es más grande y similar en tamaño al bivalente autosómico menor, siendo difícil su identificación en diacinesis y metafase I (**Figura 26f; 27b, c**).



**Figura 26.** Meiosis en *Jadera sanguinolenta*. (a) Prometáfase mitótica; (b) Paquítena; (c) Estadio difuso; (d) Diacinesis; (e, f) Metafase I, flechas vacías señalan al bivalente autosómico mayor con dos quiasmas; (g) Metafase II, flecha vacía señala al autosoma mayor; (h) Diacinesis; (i) Metafase I, (h, i) flechas vacías señalan al par autosómico mayor como univalentes; (j) Metafase II, flecha vacía señala al par de univalentes asociados en un pseudobivalente. Flechas negras: cromosoma sexual X; cabezas de flecha negras: cromosomas *m*; asteriscos: bivalentes autosómicos con dos quiasmas. Barra= 10  $\mu$ m.





**Figura 27.** Meiosis en *Jadera haematoloma*. (a) Diacinesis, flecha vacía señala al bivalente autosómico mayor con dos quiasmas, flecha negra al cromosoma X de tamaño pequeño; (b) Diacinesis; (c) Metáfase I, (b, c) flechas negras señalan al cromosoma X de tamaño grande; (d) Metáfase II; (e) Anáfase II; (f) Telófase II. Cabezas de flecha negras: cromosomas *m*; flechas vacías: par autosómico mayor; asteriscos: bivalentes autosómicos con dos quiasmas. Barra= 10  $\mu$ m.

**Tabla 15.** Frecuencia media de quiasmas y porcentaje de células con univalentes en diacinesis-metafase I en individuos de *Jadera haematoloma* y *Jadera sanguinolenta*

<i>Jadera sanguinolenta</i>				
Procedencia	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I	Porcentaje de células con univalentes
Reserva Provincial isla Martín García (Provincia de Buenos Aires)	IMG-1	74	4,3±0,1 (S=0,4699/ $\Phi$ = 73)	72,97
	IMG-2	80	4,7±0,2 (S=0,7876/ $\Phi$ = 79)	61,25
	IMG-3	33	5,5±0,3 (S=0,7942/ $\Phi$ = 32)	33,33
	IMG-4	10	4,9±0,4 (S=0,5676/ $\Phi$ = 9)	30,00
	IMG-5	14	4,9±0,4 (S=0,6157/ $\Phi$ =13)	21,43
	IMG-6	97	5,70±0,14 (S=0,6795/ $\Phi$ = 97)	5,15
	IMG-7	67	6,0±0,2 (S=0,7171/ $\Phi$ = 66)	4,48
	IMG-8	19	5,8±0,4 (S=0,7133/ $\Phi$ = 18)	0,00
	IMG-9	9	5,5±0,6 (S=0,6265/ $\Phi$ = 8)	nd
	IMG-10	8	5,8±0,4 (S=0,4629/ $\Phi$ = 7)	nd
Guauguaychú (Provincia de Entre Ríos)	G-1	20	4,8±0,5 (S=0,9515/ $\Phi$ = 19)	55,00
	G-2	56	4,6±0,2 (S=0,6988/ $\Phi$ = 56)	48,21
	G-3	11	4,7±0,6 (S=0,9045/ $\Phi$ = 10)	45,45
	G-4	19	5,4±0,4 (S=0,6840/ $\Phi$ = 18)	21,00
	G-5	10	5,6±0,6 (S=0,8433/ $\Phi$ = 9)	20,00
	G-6	11	5,2±0,5 (S=0,7508/ $\Phi$ = 10)	18,18
	G-7	75	5,7±0,1 (S=0,4642/ $\Phi$ = 74)	0,00
	G-8	7	4,4±0,8 (S=0,7868/ $\Phi$ = 6)	nd
	G-9	4	5,3±1,8 (S=0,9574/ $\Phi$ = 73)	nd
Parque Nacional Iguazú (Provincia de Misiones)	PNI-1	33	4,7±0,3 (S=0,7613/ $\Phi$ = 32)	57,57
	PNI-2	13	4,6±0,4 (S=0,6504/ $\Phi$ = 12)	46,15
	PNI-3	48	4,7±0,2 (S=0,7293/ $\Phi$ = 47)	41,66
	PNI-4	35	5,3±0,3 (S=0,9056/ $\Phi$ = 34)	31,43
	PNI-5	59	5,7±0,2 (S=0,8520/ $\Phi$ = 58)	16,95
	PNI-6	43	5,2±0,2 (S=0,7184/ $\Phi$ = 42)	16,28
	PNI-7	40	5,1±0,2 (S=0,6325/ $\Phi$ = 39)	15,00
	PNI-8	32	5,2±0,2 (S=0,5351/ $\Phi$ = 31)	6,25
	PNI-9	9	4,7±0,4 (S=0,5000/ $\Phi$ = 8)	nd

<i>Jadera haematoloma</i>				
Procedencia	Individuo	Total de células	Frecuencia media de quiasmas en diacinesis-metafase I	Porcentaje de células con univalentes
Reserva Provincial isla Martín García (Provincia de Buenos Aires)	IMG-1	11	5,4±0,5 (S=0,6876/Φ= 10)	9,09
	IMG-2	13	5,3±0,4 (S=0,6304/Φ= 12)	7,69
	IMG-3	54	5,6±0,2 (S=0,6564/Φ= 53)	7,40
	IMG-4	29	5,5±0,2 (S=0,5724/Φ= 28)	3,45
	IMG-5	22	5,5±0,2 (S=0,5096/Φ=21)	0,00
	IMG-6	57	5,9±0,2 (S=0,4795/Φ= 56)	0,00
	IMG-7	24	5,9±0,3 (S=0,6124/Φ= 23)	0,00
	IMG-8	5	5,6±0,8 (S=0,5477/Φ= 4)	nd
	IMG-9	3	6,00 (S=0/Φ= 2)	nd
Guaileguaychú (Provincia de Entre Ríos)	G-1	49	5,7±0,2 (S=0,5401/Φ= 48)	2,04
	G-2	4	5,5±1,1 (S=0,5774/Φ= 3)	nd

<sup>a)</sup> los límites fiduciales corresponden a la distribución *t* de Student para un nivel de confianza de 95%, con Φ grados de libertad; nd, no determinado debido a que sólo espermátidas fueron encontradas en los testículos; nd, no determinada debido al bajo número de células analizadas

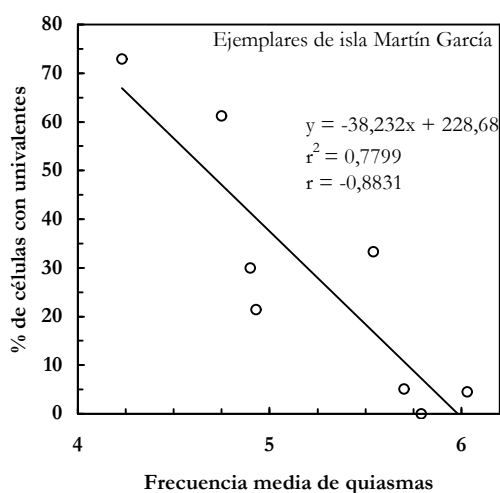
Los bivalentes autosómicos presentan generalmente un quiasma terminal; sin embargo, el bivalente mayor y, menos frecuentemente, otros bivalentes, muestran dos quiasmas (**Figura 26d-f, h; 27a**). Asimismo, en una baja frecuencia se observaron células con dos bivalentes en anillo (**Figura 26d, h; 27a**), mientras que la presencia de células con tres o cuatro bivalentes en anillo fue aun más rara. La frecuencia media de quiasmas en células en diacinesis-metafase I varía entre 5,30 y 6,00 y entre 4,23 y 6,03 en *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta*, respectivamente (**Tabla 15**). El análisis de varianza anidado reveló la existencia de diferencias significativas entre la frecuencia media de quiasmas de *J. haematoloma* y *J. sanguinolenta*. Asimismo, se encontró una gran diversidad no sólo entre células de un mismo individuo sino también entre individuos de una misma población (**PUBLICACION IV, Tabla 2**).

De acuerdo con el porcentaje de univalentes, todos los individuos analizados, independientemente de su procedencia, pueden ser agrupados dentro de tres categorías: baja (entre 0,00 y 9,09 todos los especímenes de *Jadera haematoloma*, entre 0,00 y 6,25 cinco de *J. sanguinolenta*); media (entre 15,00 y 33,33 diez especímenes de *J. sanguinolenta*) y alta (entre 41,66 y 72,97 ocho especímenes de *J. sanguinolenta*) (**PUBLICACION IV, Figura 3**). Con respecto al

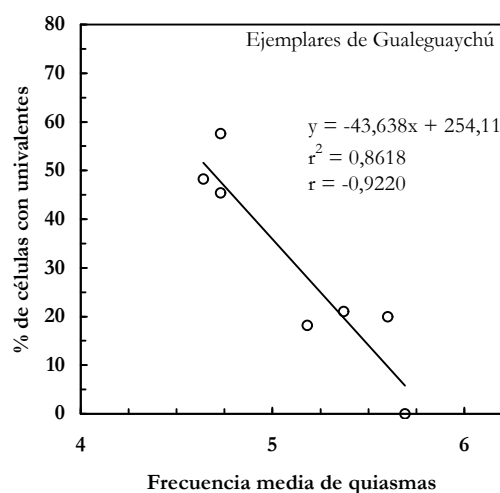
comportamiento meiótico de los univalentes autosómicos, su presencia fue observada a partir de diplotene. En metafase I los univalentes se ubicaron en el plano ecuatorial formando parte del anillo de bivalentes autosómicos y se orientaron con su eje longitudinal paralelo a las fibras del huso (**Figura 27i**). En anafase I, los univalentes autosómicos se dividieron ecuacionalmente y migraron sincrónicamente con los autosomas. En metafase II las cromátides no hermanas se asociaron extremo con extremo, formando un pseudobivalente en 94% de las células (**Figura 26j**), mientras que en 6% de las células permanecieron separadas. En anafase II no se observaron cromosomas rezagados. Si bien todos los núcleos telofásicos analizados mostraron  $5A+m+X$  o  $5A+m$ , un bajo porcentaje de células (aproximadamente 3%) podrían ser aneuploides.

De acuerdo al análisis de regresión (**Figura 28**) se concluye que las muestras de *Jadera sanguinolenta* procedentes de isla Martín García, Gualeguaychú y Parque Nacional Iguazú presentan correlaciones negativas y significativas (**Figura 28a, b, c**). Es de remarcar que las pendientes y ordenadas al origen de las rectas obtenidas por regresión muestran valores muy similares entre sí.

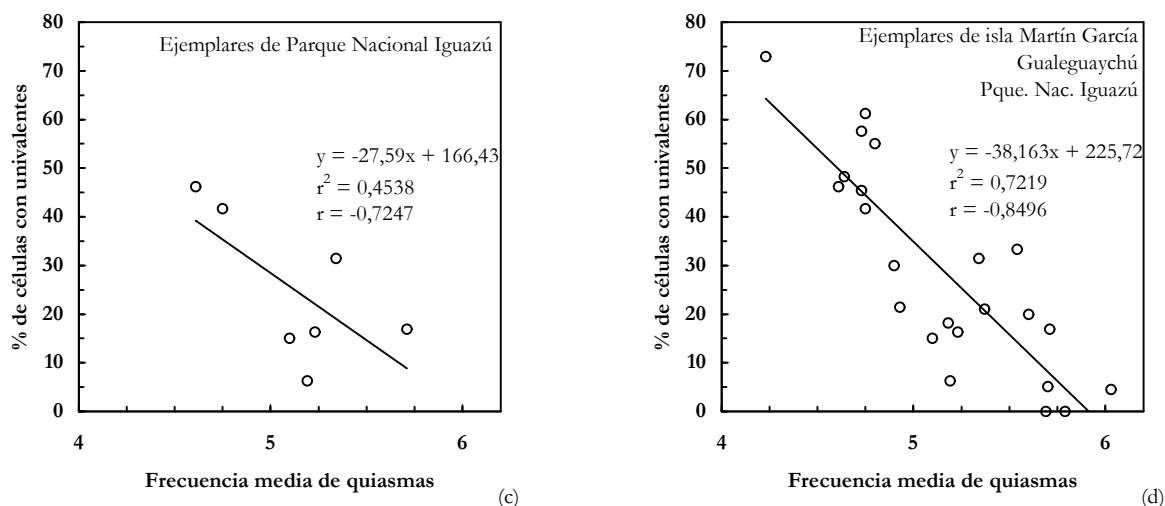
A los fines de verificar que las tres muestras siguen la misma dinámica en cuanto a la formación de univalentes se realizó el siguiente procedimiento. En primer lugar, se realizó un análisis de regresión conjunto para las tres muestras obteniéndose los parámetros de la recta de regresión presentados en la **Figura 28 (d)**. Para determinar si la pendiente de las rectas correspondientes a cada una de las muestras no difieren significativamente de la pendiente estimada para el conjunto de las tres muestras se calcularon los intervalos de confianza de las pendientes de cada una de las muestras individuales. Para las muestras de isla Martín García, Gualeguaychú y Parque Nacional Iguazú se obtuvieron las siguientes estimaciones: a)  $-38,23 \pm 13,43$ , b)  $-43,64 \pm 8,01$  y c)  $-27,59 \pm 14,47$ , respectivamente.



(a)



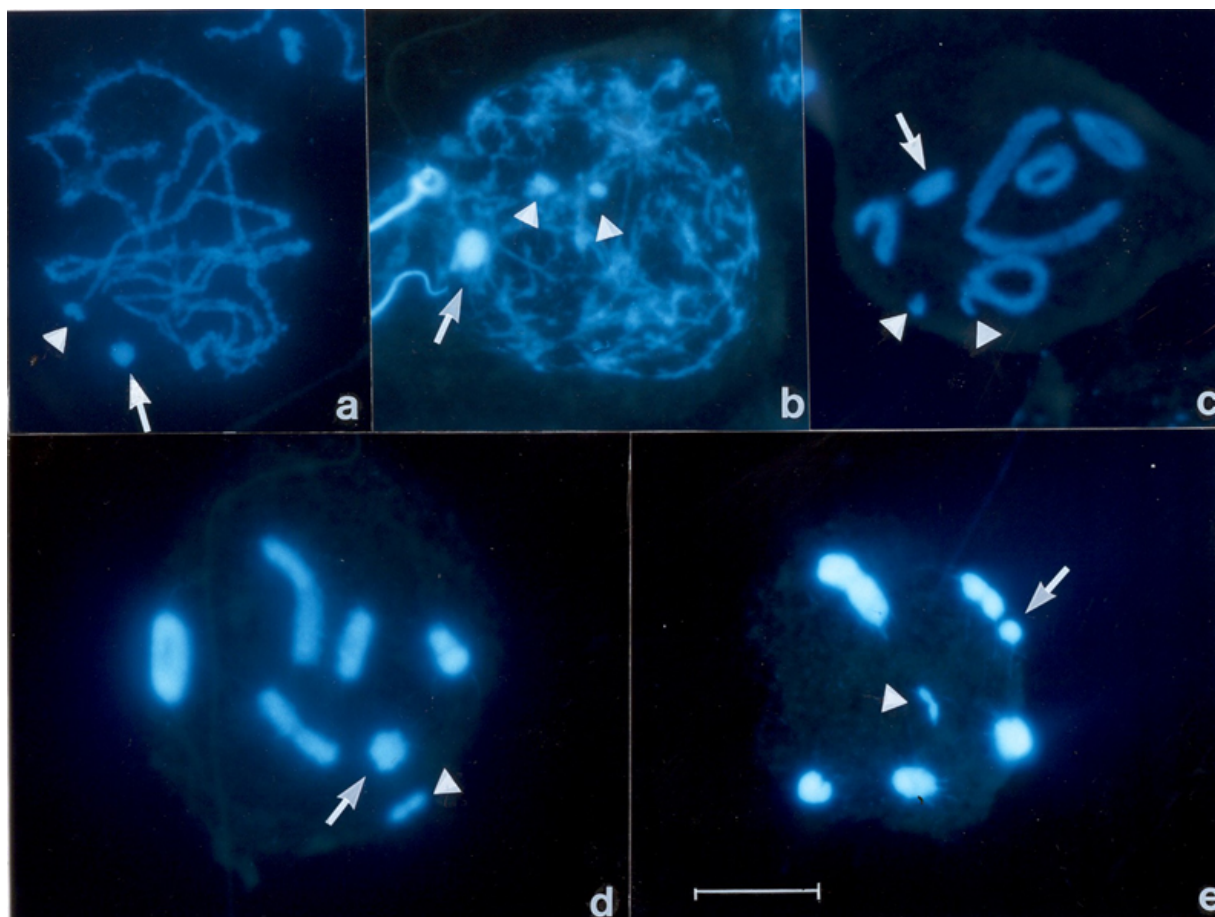
(b)



**Figura 28.** Análisis de regresión del porcentaje de células con univalentes en función de la frecuencia media de quiasmas en los ejemplares de *Jadera sanguinolenta* de (a) isla Martín García, (b) GUAleguaychú, (c) Parque Nacional Iguazú y (d) conjunto de ejemplares de las tres poblaciones. En las rectas de regresión “y” representa el porcentaje de células con univalentes, “x” es la frecuencia media de quiasmas y r es el coeficiente de correlación de Pearson.

El valor modal de la pendiente correspondiente a la regresión del conjunto de las tres muestras presentado en la **Figura 28 (d)** resultó -38,16, el cual se encuentra dentro de los límites de confianza de las estimaciones de las pendientes individuales. Este resultado permite inferir que las tres muestras de *J. sanguinolenta* presentan la misma dinámica en la formación de univalentes.

El análisis citogenético mediante la tinción con DAPI muestra resultados concordantes para ambas especies. En profase meiótica temprana los cromosomas *m* y X se distinguen claramente como elementos DAPI positivos (**Figura 29a, b**). En diacinesis todos los cromosomas presentan una tinción fluorescente homogénea (**Figura 29c, d**), mientras que el pseudobivalente *m* es DAPI negativo en metafase I (**Figura 29e**). Cabe señalar, que no se observaron bandas DAPI positivas en los autosomas en diacinesis-metafase I.



**Figura 29.** Meiosis en *Jadera sanguinolenta* (con DAPI). (a) Paquitene; (b) Estadio difuso; (c) Diacinesis temprana; (d) Diacinesis; (e) Metafase I. Flechas blancas: cromosoma X; cabezas de flecha blancas: cromosomas *m*. Barra=10  $\mu$ m.

## 14. Estudios Moleculares y Citogenético-Moleculares

El estudio de los caracteres moleculares se realizó mediante la extracción de ADN genómico total de ejemplares fijados en alcohol metílico:alcohol etílico (1:1) y de ejemplares conservados en nitrógeno líquido a -70°C (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Detalle de las distintas especies de las familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae según el procedimiento de fijación

Taxon	Código de referencia	Fijación	
<b>Familia Coreidae</b>			
<i>Leptoglossus impictus</i>	L.i.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	-70°C
<i>Athaumastus haematicus</i>	A.h.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	---
<i>Phthia picta</i>	P.p.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	---
<i>Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer</i>	H.b.b.	---	-70°C
<b>Familia Largidae</b>			
<i>Largus fasciatus</i>	L.f.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	---
<i>Largus rufipennis</i>	L.r.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	-70°C
<b>Familia Lygaeidae</b>			
<i>Lygaeus alboornatus</i>	L.a.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	-70°C
<b>Familia Pyrrhocoridae</b>			
<i>Dysdercus albofasciatus</i>	D.a.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	-70°C
<i>D. chaquensis</i>	D.ch.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	-70°C
<i>D. ruficollis</i>	D.r.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	-70°C
<b>Familia Rhopalidae</b>			
<i>Jadera sanguinolenta</i>	J.s.	alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	-70°C



### 14.1. Comparación de los diferentes métodos de fijación

Los resultados del análisis molecular de las muestras de ADN genómico total extraídas mediante los diferentes protocolos de extracción utilizados, revelan que el ADN obtenido a partir de ejemplares fijados en alcohol metílico:alcohol etílico (1:1) resulta completamente degradado (**Figura 30, Calles 1-4**).

Por el contrario, el ADN genómico total extraído a partir de ejemplares conservados en nitrógeno líquido no presenta signos de degradación, siendo factible, por consiguiente, la visualización de una banda conspicua de alto peso molecular ( $\sim 21.226$  pb) luego de ser sometida la muestra a una electroforesis en geles de agarosa (**Figura 30, Calles 5-8; Figura 31**).

Asimismo, cabe destacar que las muestras de ADN genómico correspondientes a las calles 5-8 (**Figura 30**) no fueron tratadas con ARNasa; por tal motivo se observa la presencia de un chorreado en la parte inferior del gel de agarosa correspondiente a fragmentos de ADN de aproximadamente 947 pb.

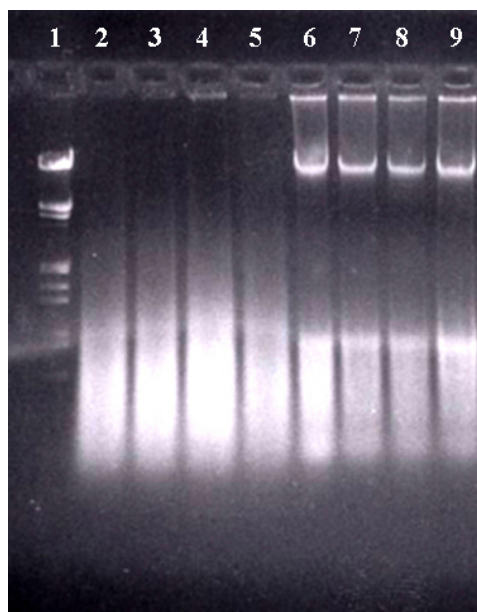
### 14.2. Resultados de los distintos protocolos de extracción utilizados

Al comparar las diferentes muestras de ADN obtenidas a partir de ejemplares conservados en nitrógeno líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$  y extraídas mediante los distintos protocolos de extracción utilizados, mencionados en el acápite correspondiente de la sección Materiales y Métodos, es factible observar diferencias en el rendimiento de las muestras.

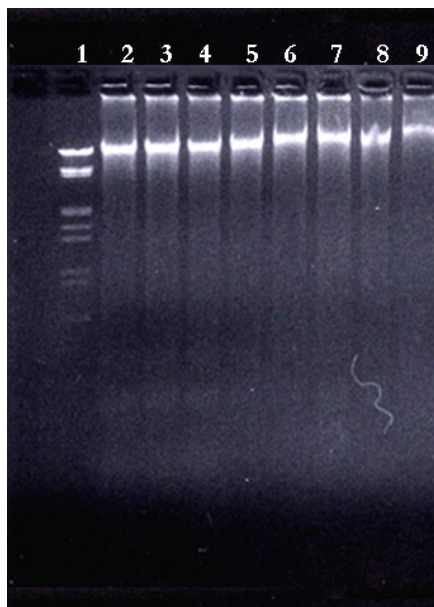
Por un lado, cuando las muestras son tratadas únicamente con fenol en el primer paso de extracción fenólica, se observa que el ADN presenta un alto grado de degradación (**Figura 32, calles 2-7**).

Por otro lado, cuando las muestras son tratadas con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) durante ese primer paso, el ADN genómico obtenido no presenta ningún signo de degradación (**Figura 32, calles 8-9**).

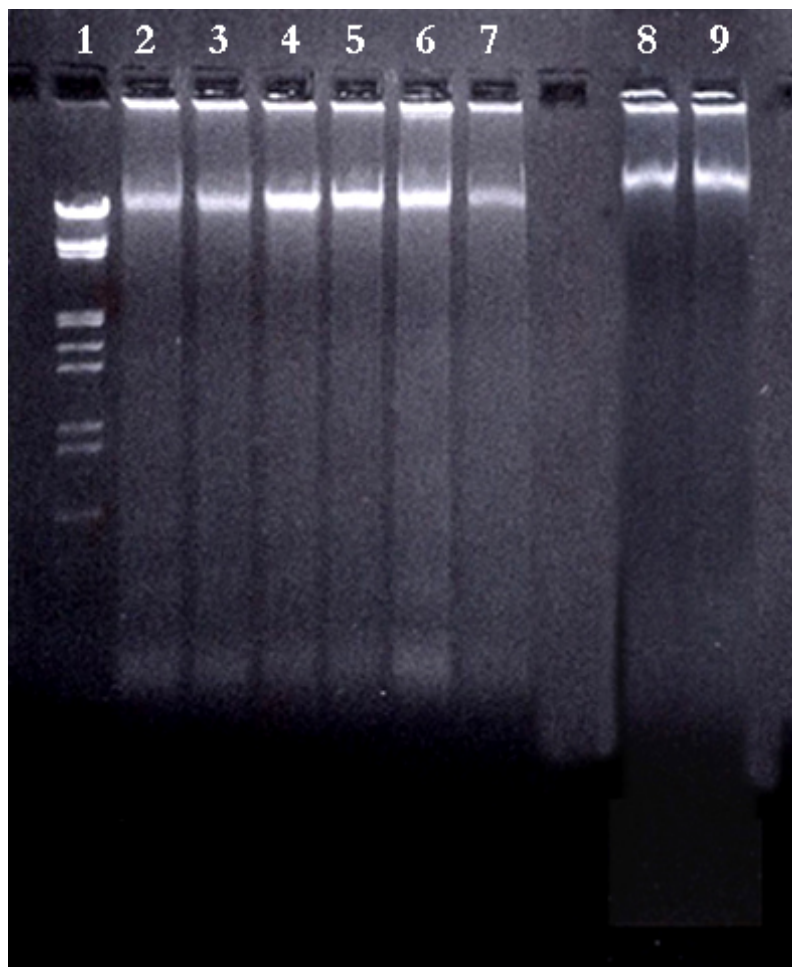
Por último, cabe destacar que los resultados obtenidos de la purificación adicional mediante la precipitación con espermina revelaron que ésta no influye sobre la calidad del ADN genómico total.



**Figura 30.** Efecto del método de fijación empleado sobre la obtención de ADN genómico total. (**Calle 1**) Marcador de peso molecular: fago Lambda (EcoR I+Hind III); (**Calle 2-5**) ADN extraído de ejemplares de *Dysdercus chaquensis* fijados en alcohol metílico:alcohol etílico (1:1); (**Calle 6-9**) ADN extraído de ejemplares de *D. chaquensis* conservados en nitrógeno líquido. El ADN extraído no fue tratado con ARNasa.



**Figura 31.** Tratamiento de las muestras de ADN genómico total con ARNasa. (**Calle 1**) Marcador de peso molecular : fago Lambda (EcoR I+Hind III); (**Calle 2-10**) ADN extraído de ejemplares de *Largus rufipennis* conservados en nitrógeno líquido.



**Figura 32.** Muestras de ADN genómico total correspondientes a ejemplares de *Dysdercus albofasciatus* (conservados en nitrógeno líquido). (**Calle 1**) Marcador de peso molecular: fago Lambda (EcoR I+Hind III); (**Calle 2-7**) extracción fenólica; (**Calle 8-9**) extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.

### 14.3. Resultados obtenidos de la digestión de las muestras de ADN genómico total con diferentes endonucleasas de restricción

La digestión con enzimas de restricción de las muestras de ADN, extraído a partir de los ejemplares fijados en alcohol metílico:alcohol etílico (1:1), fue descartada debido a las condiciones de degradación presentes en ellas. El ADN genómico total extraído de los ejemplares conservados en nitrógeno líquido fue digerido con trece endonucleasas de restricción de diferente longitud de corte (**Tabla 17**):

(a) corte frecuente: Alu I, Hinf I, Hae III, Taq I

(b) corte infrecuente: BamH I, Bgl II, EcoR I, EcoR V, Hind III, Pst I, Sma I, Sal I, Xba I

**Tabla 17.** Detalle de los resultados obtenidos de la digestión de las muestras de ADN genómico total con diversas endonucleasas de restricción

Taxon	Endonucleasas de restricción												
	Alu I	Hae III	Hinf I	Taq I	BamH I	Bgl II	EcoR I	EcoR V	Hind III	Pst I	Sal I	Sma I	Xba I
H.b.b.	T	S	S	T	S	---	S	S	S	S	S	S	S
L.i.	P	S	S	T	S	---	S	S	S	S	S	S	S
L.r.	T	T	T	T	P	P	P	---	P	S	S	S	P
L.a.	S	S	S	T	---	---	---	---	---	---	---	S	---
D.a.	P	P	P	T	S	S	P	P	S	S	S	S	S
D.ch.	T	T	T	T	S	S	T	T	S	S	S	S	S
D.r.	T	S	S	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S
J.s.	T	T	T	T	T	T	---	T	S	---	S	S	S

H.b.b., *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer*; L.i., *Leptoglossus impictus*; L.r., *Largus rufipennis*; L.a., *Lygaeus alboornatus*; D.a., *Dysdercus albofasciatus*; D.ch., *Dysdercus chaquensis*; D.r., *Dysdercus ruficollis*; J.s., *Jadera sanguinolenta*.

T, digestión total; P, digestión parcial; S, sin digestión

En el caso de las muestras de ADN genómico total que fueron tratadas con Alu I se observó una digestión total únicamente en las correspondientes a *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer* (**Figura 33**), *Largus rufipennis* (**Figura 35**), *Dysdercus chaquensis* (**Figura 36**), *D. ruficollis* (**Figura 37**) y *Jadera sanguinolenta* (**Figura 38**); las muestras de *Leptoglossus impictus* y *Dysdercus albofasciatus* experimentaron una digestión parcial (**Figuras 34, 36**). Además, esta endonucleasa no reconoció sitios de corte en la muestra de ADN de *Lygaeus alboornatus* (**Tabla 17**).

Por otro lado, de las muestras de ADN tratadas con las enzimas de corte frecuente Hinf I y Hae III sólo las muestras de *Largus rufipennis* (**Figura 35**), *Dysdercus chaquensis* (**Figura 36**) y *Jadera sanguinolenta* evidenciaron una digestión total, mientras que se observó una digestión parcial en *Dysdercus albofasciatus* (**Figura 36**) y ningún signo de digestión en las muestras de *Lygaeus alboornatus*, *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer*, *Leptoglossus impictus* y *Dysdercus ruficollis* (**Figuras 33, 34, 37**) (**Tabla 17**).

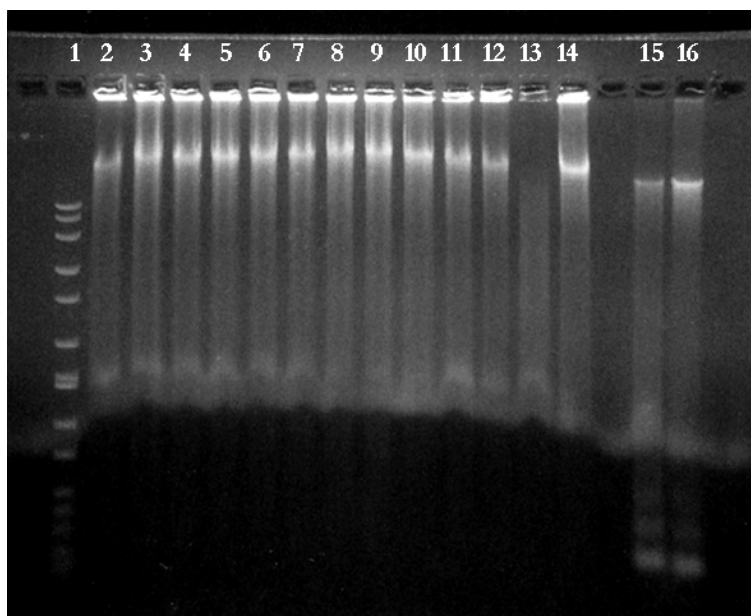
La totalidad de muestras de ADN genómico total tratadas con la enzima de corte frecuente Taq I experimentaron una digestión total (**Figuras 33-38**) (**Tabla 17**).

Con respecto a los resultados del tratamiento con las endonucleasas de corte infrecuente, en las muestras de ADN de *Largus rufipennis* se observó una digestión parcial al ser tratadas con BamH I, Bgl II, EcoR I y Hind III, mientras que las muestras tratadas con EcoR V, Pst I, Sal I, Sma I y Xba I no experimentaron signos de digestión (**Figura 35**) (**Tabla 17**).

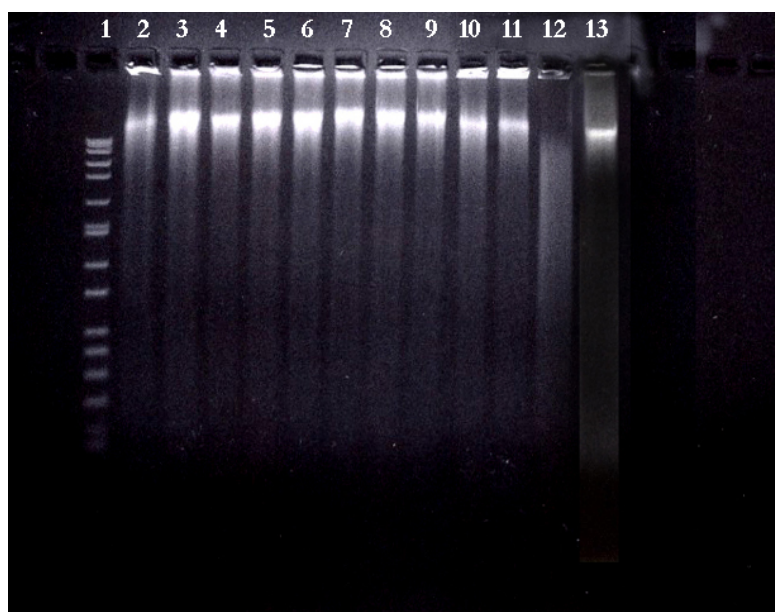
Las muestras de ADN de *Dysdercus albofasciatus* y *D. chaquensis* tratadas con EcoR I y EcoR V evidenciaron una digestión parcial, mientras que con las restantes endonucleasas de corte poco frecuente no experimentaron ningún signo de digestión (**Figura 36**).

En las muestras de *Jadera sanguinolenta* tratadas con BamH I, Bgl II y EcoR V se observó una digestión total y en las muestras tratadas con las restantes endonucleasas no se evidenció ningún signo de digestión (**Figura 38**) (**Tabla 17**).

Por último, en las muestras de ADN de *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer*, *Leptoglossus impictus* y *Dysdercus ruficollis* no se comprobó la presencia de ningún grado de digestión cuando se trataron con BamH I, Bgl II, EcoR I, EcoR V, Hind III, Pst I, Sal I, Sma I y Xba I (**Figuras 33, 34, 37**) (**Tabla 17**).

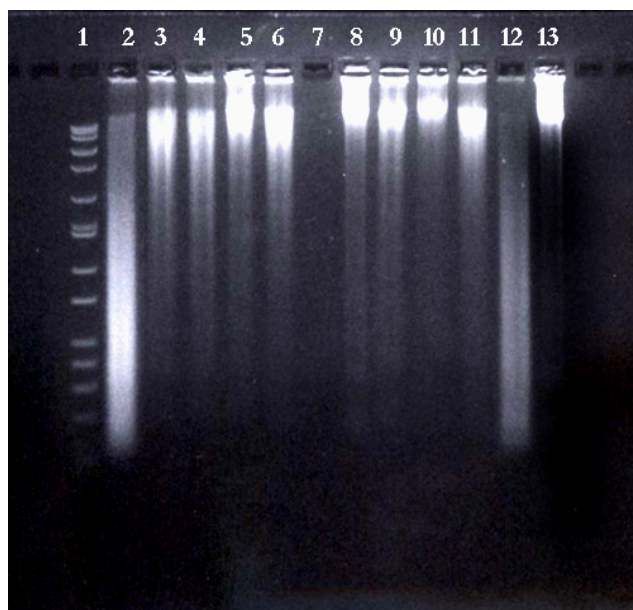


**Figura 33.** Digestión con endonucleasas de restricción de muestras de ADN genómico total de *Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer*. (**Calle 1**) ADN marcador de 16 fragmentos (50-10.000 pb); (**calle 2**) Alu I; (**calle 3**) EcoR I; (**calle 4**) Hind III; (**calle 5**) BamH I; (**calle 6**) EcoR V; (**calle 7**) Pst I; (**calle 8**) Sal I; (**calle 9**) Xba I; (**calle 10**) Sma I; (**calle 11**) Hinf. I; (**calle 12**) Hae III; (**calle 13**) Taq I; (**calle 14**) control negativo.

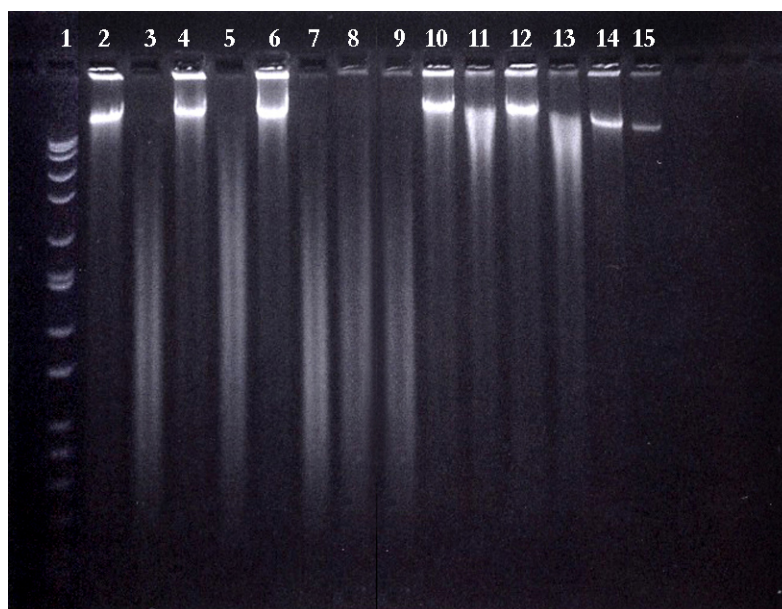


**Figura 34.** Digestión con endonucleasas de restricción de muestras de ADN genómico total de *Leptoglossus impictus*. (**Calle 1**) ADN marcador de 16 fragmentos (50-10.000 pb); (**calle 2**) Alu I; (**calle 3**) EcoR I; (**calle 4**) Hind III; (**calle 5**) BamH I; (**calle 6**) EcoR V; (**calle 7**) Pst I; (**calle 8**) Sal I; (**calle 9**) Xba I; (**calle 10**) Hinf. I; (**calle 11**) Hae III; (**calle 12**) Taq I; (**calle 13**) control negativo.



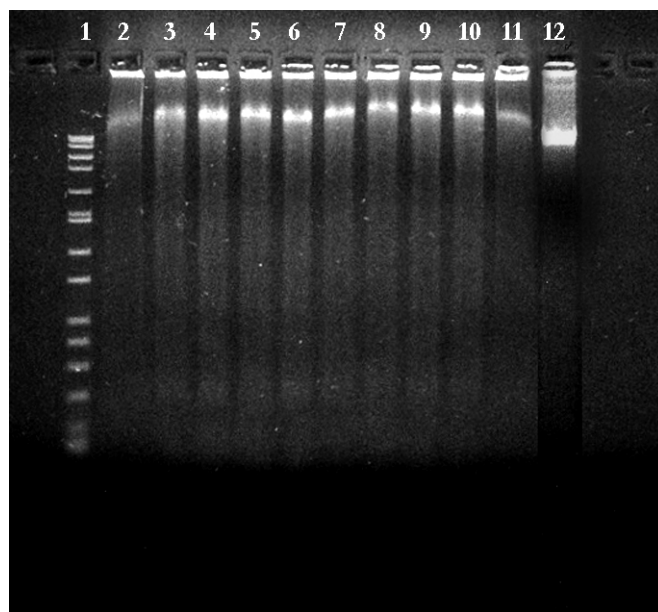


**Figura 35.** Digestión con endonucleasas de restricción de muestras de ADN genómico total de *Largus rufipennis*. (**Calle 1**) ADN marcador de 16 fragmentos (50-10.000 pb); (**calle 2**) Alu I; (**calle 3**) EcoR I; (**calle 4**) Hind III; (**calle 5**) BamH I; (**calle 6**) Bgl II; (**calle 7**) EcoR V; (**calle 8**) Pst I; (**calle 9**) Sal I; (**calle 10**) Sma I; (**calle 11**) Xba I; (**calle 12**) Taq I; (**calle 13**) control negativo.

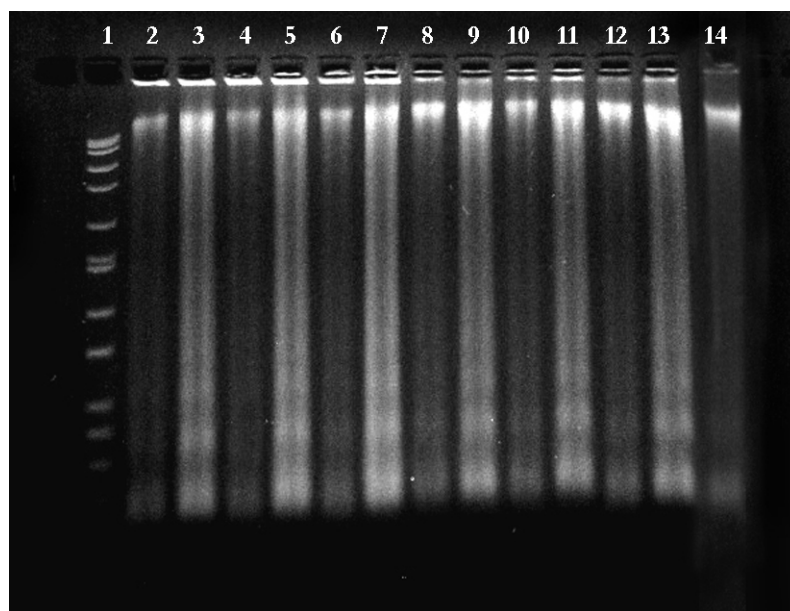


**Figura 36.** Digestión con endonucleasas de restricción de muestras de ADN genómico total de *Dysdercus albofasciatus* (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12) y *Dysdercus chaquensis* (calles 3, 5, 7, 9, 11, 13). (**Calle 1**) ADN marcador de 16 fragmentos (50-10.000 pb); (**calles 2, 3**) Alu I; (**calle 4, 5**) Hae III; (**calle 6, 7**) Hinf I; (**calle 8, 9**) EcoR I; (**calle 10, 11**) EcoR V; (**calle 12, 13**) Taq I; (**calle 14, 15**) controles negativos.





**Figura 37.** Digestión con endonucleasas de restricción de muestras de ADN genómico total de *Dysdercus ruficollis*. (**Calle 1**) ADN marcador de 16 fragmentos (50-10.000 pb); (**calle 2**) Alu I; (**calle 3**) EcoR I; (**calle 4**) Hind III; (**calle 5**) BamH I; (**calle 6**) Bgl II; (**calle 7**) EcoR V; (**calle 8**) Pst I; (**calle 9**) Sal I; (**calle 10**) Xba I; (**calle 11**) Sma I; (**calle 12**) control negativo.



**Figura 38.** Digestión con endonucleasas de restricción de muestras de ADN genómico total de *Jadera sanguinolenta*. (**Calle 1**) ADN marcador de 16 fragmentos (50-10.000 pb); (**calle 2, 3**) Alu I; (**calle 4, 5**) Hae III; (**calle 6, 7**) Hinf. I; (**calle 8, 9**) BamH I; (**calle 10, 11**) Bgl II; (**calle 12, 13**) EcoR V; (**calle 14**) control negativo.

#### 14.4. Resultados obtenidos de la purificación adicional de las muestras de ADN genómico total

Sólo las muestras de ADN genómico total de ejemplares conservados en nitrógeno líquido se purificaron mediante la precipitación con tetrahidrocloreuro de espermina (50mM). Los resultados obtenidos no revelaron diferencias entre las muestras de ADN no purificadas y purificadas con respecto al grado de digestión con las endonucleasas de restricción utilizadas.

#### 14.5. Hibridación *in situ*

Un fenómeno particular ocurrió con todas las muestras de ADN genómico total extraídas a partir de ejemplares de *Jadera sanguinolenta* conservados en nitrógeno líquido a -70°C. Al realizar la corrida electroforética para evaluar la calidad y concentración del ADN obtenido, se obtuvo de manera regular y constante la aparición de cuatro bandas, si bien no se había utilizado ninguna endonucleasa de restricción.

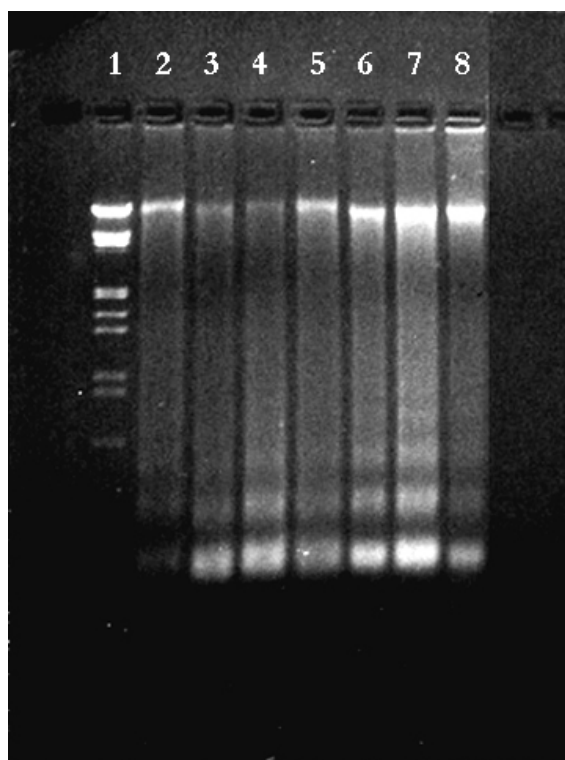
Estas bandas eran:

- (1) ADN de alto peso molecular (~21.226 pb)
- (2) ADN de ~564 pb
- (3) y (4) ADN menor que 125 pb, independientemente del protocolo de extracción utilizado para la obtención de las mismas (**Figura 39**).

Con el fin de caracterizar mejor el ADN presente en dichas bandas se realizó su elución mediante el kit de extracción QIAquick (QIAGene, Alemania).

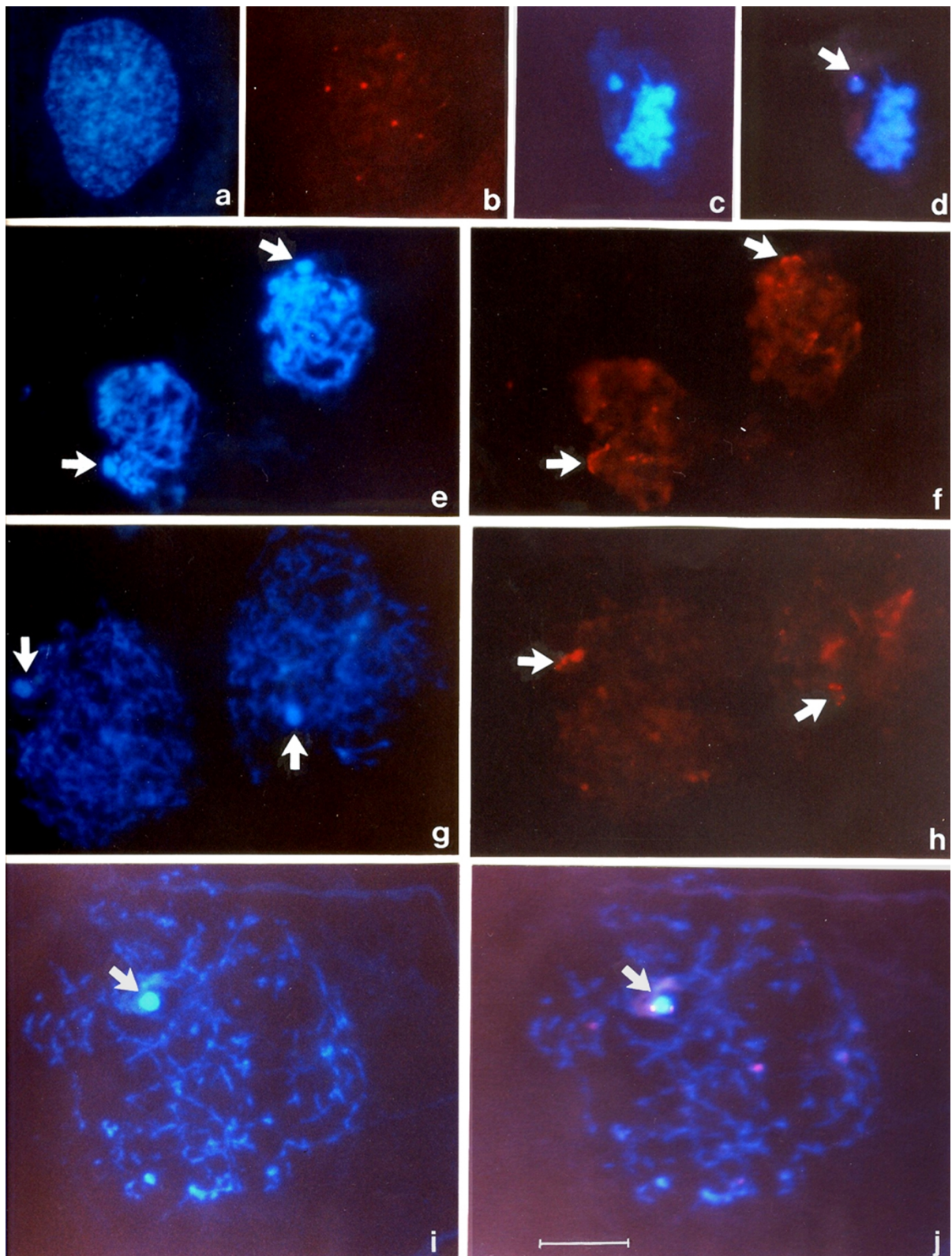
Una hipótesis de trabajo fue que estas bandas podían corresponder a ADN altamente repetitivo, que por alguna causa se separaban naturalmente del ADN de alto peso molecular.

A fin de determinar si estas bandas de ADN tenían una localización particular en los cromosomas de *Jadera sanguinolenta* se marcaron las bandas mediante técnicas convencionales de “nick translation” utilizando biotina 16-dUTP y su posterior hibridación sobre preparaciones cromosómicas de esta especie.



**Figura 39.** Corrida electroforética de muestras de ADN genómico total de ejemplares de *Jadera sanguinolenta*. (**Calle 1**) ADN marcador: fago Lambda (EcoR I+Hind III).

Los resultados obtenidos revelaron que en células interfásicas la sonda (3) híbrida en seis o siete focos puntuales dispersos por el núcleo (**Figura 39a, b**). En células meióticas las señales de hibridación se detectan también de manera localizada y no dispersa en la cromatina. Las señales más conspicuas están en las regiones teloméricas del cromosoma sexual X, tal como se observa en células en leptotene-cigotene (**Figura 39c, d**), en paquitene (**Figura 39e, f**) y en el estadio difuso (**Figura 39g-j**). Si bien las otras señales de hibridación son definidas, no fue posible determinar su localización precisa en un par de autosomas o en el par de cromosomas *m*.



**Figura 40.** Tinción con DAPI (azul) (a, c, e, g, i) e hibridación *in situ* con la sonda (3) marcada con digoxigenina (rojo) (b, d, f, h, j) en células meióticas de *Jadera sanguinolenta*. (a, b) Célula interfásica; (c, d) Leptotene; (e, f) Paquítene; (g-j) Estadio difuso. Flechas blancas: señales de hibridación en cromosoma sexual X. Barra= 10  $\mu$ m.



## DISCUSION

Dado que las especies de Heteroptera han logrado ocupar una gran variedad de habitats, es muy importante conocer los ambientes donde se desarrollan para poder no sólo recolectarlos sino también estudiarlos en su medio; sólo la práctica y la observación van dando la pauta y el conocimiento para saber en qué lugar poder capturarlos, ya sea bajo troncos, piedras y corteza suelta, en frutos y troncos en descomposición, entre hojas caídas, en ramas de árboles y arbustos, sobre flores o en pastizales.

Todas las especies analizadas en el presente trabajo de Tesis son fitófagas y de interés agroeconómico para nuestro país por su incidencia desfavorable en el desarrollo y rendimiento de varios cultivos de gran valor económico. Sin embargo, uno de los inconvenientes que se suscitaron en la recolección de los ejemplares fue la imposibilidad de hallarlos sobre los cultivos, debido a que estos son tratados con insecticidas para combatir a las diversas plagas. Sólo *Athaumastus haematicus*, *Phthia picta* (Coreidae) y *Dysdercus chaquensis* (Pyrrhocoridae) pudieron ser encontradas sobre cultivos orgánicos de zapallo, tomate y algodón, respectivamente.

Por otra parte, para recolectar es necesario observar con detenimiento todos los detalles del ambiente, ya que existen otras variables que se deben evaluar cuando uno realiza la recolección de insectos. Algunas de ellas están relacionadas con características biológicas de cada especie, tales como el ciclo biológico, el número de generaciones anuales, la modalidad reproductiva, el estado ninfal, si transcurre el invierno en estado adulto o ninfal, competencia con otras especies; mientras que otras dependen del clima, de las áreas ecológicamente más adecuadas para el desarrollo de las especies, de las características de las formaciones bióticas o tipos de vegetación. El período de recolección más apropiado para la mayoría de las especies de Heteroptera en estado adulto es el comprendido entre los meses de octubre y mayo, y su extensión depende de las condiciones meteorológicas reinantes (período de lluvias, temperatura, inundaciones, viento y vegetación).

Con el fin de ilustrar lo mencionado anteriormente, se detallan las características biológicas de algunas de las especies aquí analizadas que fueron consideradas al momento de la recolección, al igual que ciertas características correspondientes a los distritos biogeográficos donde fueron principalmente recolectadas. Con respecto a su biología, los adultos de *Athaumastus haematicus* (Coreidae) tienen una longevidad variada, siendo mayor en invierno debido a que pasan esta estación del año como imago. Las hembras depositan los huevos sobre hojas, tallos, brotes y otros órganos aéreos de sus plantas huésped. La duración promedio del estado ninfal es de 38 días y la del ciclo completo es de 45 días. Además, para la latitud de Buenos Aires presenta tres

generaciones por año (Rizzo 1976). Por otro lado, *Phthia picta* (Coreidae) desarrolla tres a cinco generaciones anuales a la latitud de la provincia de Buenos Aires y pasa el invierno como adulto en reposo sexual. El estado ninfal dura aproximadamente 25 días, aunque con condiciones ambientales desfavorables puede prolongarse (Rizzo 1976). El ciclo biológico de *Dysdercus chaquensis* (Pyrrhocoridae) varía entre 25 y 38 días con temperaturas de alrededor de los 30°C, prolongándose hasta cuatro meses y medio con temperaturas más bajas. A los dos o tres días de aparecidos, los adultos comienzan a copular y, después de 7-12 días, las hembras comienzan a oviponer en el suelo, bajo terrones o entre la hojarasca, e incluso en las peras del algodón (Rizzo 1976). Por último, el ciclo anual de *Dysdercus albofasciatus* (Pyrrhocoridae) comprende entre cuatro y cinco generaciones, según las condiciones meteorológicas y ambientales de cada año en particular. Los individuos adultos y ninfas V de esta especie sobreviven a la estación invernal en diapausa, ocultos en huecos en troncos de árboles, ramas, debajo de matas y entre la hojarasca. Entre principios y fines de agosto los primeros individuos adultos, que terminaron la diapausa, entran en una “época pre-reproductiva”, en la cual se observa una actividad migratoria. En función del ascenso de la temperatura se producen las primeras cópulas y las hembras grávidas depositan los huevos en lugares húmedos, en grietas del suelo o entre la hojarasca. En *D. albofasciatus* el inicio y la finalización de la diapausa se encuentran relacionados especialmente con la temperatura y el fotoperíodo, mientras que el desarrollo embrionario depende directamente de las precipitaciones y la temperatura (Stadler et al. 1987).

Con respecto a los viajes de colección, se realizaron en los territorios biogeográficos caracterizados por presentar un clima templado-cálido y una vegetación variada que incluye la selva subtropical, selva ribereña, bosque xeromórfico, bosque marginal en las orillas de los ríos y parque. Desde el punto de vista florístico, los ejemplares de las distintas especies estudiadas fueron encontrados sobre especies de Asteraceae (*Grindelia scorzonifolia*, *Coniza* sp), Convolvulaceae, Lamiaceae, Fabaceae, Malvaceae (*Pavonia malvacea*), Sapindaceae (*Allophylus* sp), Orchidaceae y Verbenaceae. Por ejemplo, los individuos de *Leptoglossus impictus* (Coreidae) fueron recolectados sobre *Grindelia scorzonifolia*; *Dysdercus albofasciatus* (Pyrrhocoridae) se capturó sobre *Pavonia malvacea* y en lugares donde esta malvácea se encuentra en asociación con *Tradescantia fluminensis*; *Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer* (Coreidae), *Dysdercus imitator* y *D. ruficollis* (Pyrrhocoridae) sobre *Pavonia malvacea*; *Jadera sanguinolenta* (Rhopalidae) sobre orquídeas, entre otros.

El conocimiento integral de las especies permite realizar las recolecciones bajo las condiciones meteorológicas y ambientales más apropiadas para obtener muestras representativas en cuanto a diversidad y tamaños, discernir cuál es el período durante el año en el que los



especímenes presentarán un gran número de células meióticas en división, para poder así caracterizarlos desde el punto de vista citogenético.

De la totalidad de especies analizadas citogenéticamente en este estudio, sólo *Leptoglossus impictus*, *Phthia picta* (Coreidae), *Largus rufipennis* (Largidae), *Dysdercus chaquensis*, *D. ruficollis* (Pyrrhocoridae), *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* (Rhopalidae) habían sido previamente estudiadas (Porter 1917, Piza 1945, 1946b, 1947a, Colombo & Bidau 1985, Mola & Papeschi 1993, 1997). Dado que los especímenes de estas especies incluidos en este trabajo de Tesis se analizaron a partir de ejemplares provenientes de lugares de recolección diferentes de los previamente citados, se consideró relevante su estudio a fin de realizar comparaciones entre las distintas poblaciones.

Como es característico de Heteroptera, todas las especies analizadas citogenéticamente poseen cromosomas holocinéticos y una meiosis de tipo pre-reduccional, i.e., los bivalentes autosómicos se dividen reduccionalmente en meiosis I, mientras que los cromosomas sexuales son aquiasmáticos y lo hacen ecuacionalmente (Ueshima 1979). En Heteroptera es posible describir un patrón común para todas las especies en términos generales. En la mayoría la profase meiótica temprana no puede ser analizada en detalle, y sólo es posible distinguir a los cromosomas sexuales por ser heteropicnóticos positivos, los cuales permanecen con esa picnosis hasta diacinesis. En cigotene se produce el apareamiento de los cromosomas homólogos y es frecuente observar al nucléolo conectado con la masa cromatínica a través de la o de las regiones organizadoras nucleolares, las cuales por lo general son de localización telomérica. En el paquitene resulta evidente la naturaleza doble de los bivalentes y, dependiendo del número de cromosomas, pueden o no contarse todos los bivalentes autosómicos así como los univalentes sexuales. Diplotene es un estadio difícil de analizar debido a la baja frecuencia con que se lo observa, lo cual es un indicio de su corta duración, y a la ligera descondensación que muestran los bivalentes autosómicos. Inmediatamente después, la célula entra en un estadio difuso que se caracteriza por la mayor o menor descondensación de la cromatina y por la persistente condensación de los cromosomas sexuales, que se manifiesta por su heteropicnosis positiva. A medida que la célula entra en diacinesis los bivalentes autosómicos se condensan y, en general, presentan un único quiasma. En diacinesis tardía los cromosomas sexuales se tornan isopicnóticos. En metafase I los bivalentes se ubican axialmente en el plano ecuatorial, mientras que los univalentes sexuales lo hacen ecuatorialmente. Como es típico en Heteroptera, en anafase I los cromosomas sexuales se dividen ecuacionalmente, mientras que los bivalentes autosómicos lo hacen de manera reduccional. La segunda división meiótica sigue sin un período de intercinesis; en metafase II los cromosomas se disponen siempre según una disposición espacial particular. En anafase II los autosomas se dividen ecuacionalmente, mientras que los

cromosomas sexuales se dividen de manera reduccional. Los cromosomas  $m$ , cuando están presentes, se caracterizan por una meiosis de tipo pre-reduccional (White 1973, Ueshima 1979).

No obstante, cada una de las especies de las familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae estudiadas en la presente Tesis posee algunas características propias debidas por ejemplo a diferencias:

- ◆ en el complemento cromosómico diploide,
- ◆ en los mecanismos de evolución del cariotipo,
- ◆ en la presencia de cromosomas supernumerarios o B,
- ◆ en la presencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales,
- ◆ en los sistemas cromosómicos de determinación del sexo,
- ◆ en la presencia/ausencia del estadio difuso y en sus características,
- ◆ en la presencia/ausencia de cromosomas  $m$ ,
- ◆ en la arquitectura de la placa metafásica,
- ◆ en el comportamiento meiótico de algunos de los cromosomas en determinados estadios,
- ◆ en la frecuencia y distribución de quiasmas y
- ◆ en la presencia de univalentes.

### Complemento Cromosómico Diploide

Si bien el número modal es considerado muchas veces como el número atávico es importante destacar que se refiere al número cromosómico diploide más frecuentemente encontrado en un determinado taxón, que podría no ser una muestra representativa de éste (Ueshima 1979).

En la familia Coreidae es usual la constancia en el complemento cromosómico diploide dentro de un mismo género, aunque han sido descriptas variaciones en el número de autosomas y/o en el sistema de determinación del sexo en algunos géneros (Ueshima 1979), lo que estaría indicando la existencia de cambios cromosómicos entre las especies de esta familia (Montgomery 1901b, 1906, Wilson 1909a, b). En particular, en la subfamilia Coreinae el número cromosómico diploide varía entre 15 ( $12+2m+X_0$ ) y 28 ( $24+2m+X_1X_2$ ). Además, esta subfamilia se caracteriza por poseer números cromosómicos altos y por poseer un mismo número modal  $2n=21=18+2m+X_0$  que el resto de la familia. Los antecedentes citogenéticos disponibles para los géneros *Athaumastus* (Mictini, Coreinae), *Leptoglossus* (Anisoscelini, Coreinae) y *Phthia* (Leptoscelidini, Coreinae), al igual que los presentes resultados del análisis de especímenes de *Athaumastus haematicus*, *Leptoglossus impictus* y *Phthia picta*, revelan que todas estas especies comparten el mismo

número cromosómico diploide  $2n = 21/22 = 18+2m+X0/18+2m+XX$  (Wilson 1907b, 1909a, Piza 1945, 1946c, 1956, Colombo & Bidau 1985). Con respecto al género *Hypselonotus* (Coreini, Coreinae), los resultados obtenidos del estudio citogenético de *Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer* muestran que se caracteriza por poseer un número diploide  $2n = 19/20 = 16+2m+X0/16+2m+XX$ , el cual sólo había sido descripto previamente en Coreinae para *Homoeocerus unipunctatus* (Toshioka 1934) (Homoeocerini), *Cletus* sp. (Parshad 1957b), *Gonocerus acuteangulatus* (Schachow 1932, Xavier 1945) y *G. juniperi triquetricoris* (Xavier 1945) (Leptoscelidini).

Desde el punto de vista citogenético, Largidae constituye una familia interesante debido a que sus especies presentan un número cromosómico diploide muy bajo y cromosomas de gran tamaño en la mayoría de ellas. Hasta el presente, las seis especies de la subfamilia Larginae estudiadas citogenéticamente se caracterizan por poseer un número de autosomas entre 10 y 14 y un sistema cromosómico de determinación del sexo X0/XX (Wilson 1909a, Piza 1946a, 1953, Banerjee 1959, Vidal & Lacau 1985). Los primeros estudios citogenéticos del género *Largus* fueron realizados por Wilson (1909a) a partir de ejemplares de *Largus cinctus* y *L. succinctus*. Más tarde, Piza (1953) describió la meiosis de *L. humilis* (como *Euryophthalmus humilis*) y, recientemente, ha sido descripta citogenéticamente *Largus fasciatus* (como *E. fasciatus*) (Vidal & Lacau 1985). Por un lado, *Largus fasciatus* (Vidal & Lacau 1985), *L. humilis* (Piza 1953), *L. rufipennis* (Piza 1946a, Mola & Papeschi 1993) y *L. succinctus* (Wilson 1909a) comparten el mismo número cromosómico diploide  $2n = 13$  ( $12+X0$ ), mientras que *Largus cinctus* posee  $2n = 11$  ( $10+X0$ ) (Wilson 1909a).

La población de *Largus fasciatus* aquí estudiada presenta resultados coincidentes con lo descripto por Vidal y Lacau (1985) en cuanto al número cromosómico diploide y al sistema cromosómico de determinación del sexo. Sin embargo, en la población aquí descripta la frecuencia media de quiasmas fue menor y se observaron marcados bloques heterocromáticos en las regiones teloméricas.

*Largus rufipennis*, en particular, se caracteriza por poseer un número cromosómico diploide bajo, cromosomas de tamaño relativamente grande y una gran diversidad en la distribución y frecuencia media de quiasmas (Piza 1946a, Mola & Papeschi 1993). Los antecedentes citogenéticos previos mencionaron la presencia de cromosomas B, células con univalentes y bivalentes en anillo en una frecuencia muy variada (Piza 1946a, Mola & Papeschi 1993). En las poblaciones estudiadas en el presente trabajo, el cariotipo, el comportamiento meiótico y la frecuencia media de quiasmas de todos los individuos procedentes de Tornquist y Costanera Norte (provincia de Buenos Aires) y de todos los ejemplares, excepto uno, provenientes del arroyo Itaembé (provincia de Misiones) coinciden con lo descripto previamente en la población

de Santo Tomé (provincia de Corrientes) (Mola & Papeschi 1993). Sin embargo, en contraste con la población de Santo Tomé, ninguno de los especímenes de las tres poblaciones aquí analizadas presentó cromosomas B (PUBLICACION I).

Hasta el presente, el análisis citogenético realizado en 26 especies pertenecientes a la subfamilia Lygaeinae (Lygaeidae) ha revelado que se caracterizan por poseer un complemento cromosómico diploide que varía entre 12 y 22 y un sistema cromosómico de determinación del sexo XY/XX, excepto *Arocatus suboeneus* que presenta el sistema múltiple  $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$  (Ueshima & Ashlock 1980). En relación con el género *Lygaeus*, sólo cuatro especies han sido previamente estudiadas: *L. equestris* (Schachow 1932, Pfaler-Collander 1941), *L. kalmii kalmii* (Ueshima & Ashlock 1980), *L. turcicus* (Wilson 1905b) y *L. simulus* (Parshad 1957a). Los antecedentes citogenéticos descriptos revelan que *L. equestris*, *L. kalmii kalmii* y *L. turcicus* comparten el mismo complemento cromosómico diploide  $2n=14$ , mientras que *L. simulus* posee  $2n=22$ . Los resultados del presente análisis citogenético de *Lygaeus alboornatus* ( $2n=12$ ) revelaron que esta especie posee el número cromosómico diploide más bajo mencionado para la subfamilia Lygaeinae (PUBLICACION IV).

La familia Pyrrhocoridae constituye un grupo heterogéneo desde el punto de vista citogenético, mostrando diferencias en los complementos cromosómicos que varían entre  $2n=13/14$  y  $2n=33/34$  (Ueshima 1979). Del mismo modo, existe diversidad en los sistemas cromosómicos de determinación del sexo (XY,  $X_1X_20$  y  $X_1X_2X_3X_4X_5X_60$ ) (Banerjee 1959). Además, no se habían descripto citogenéticamente especies con cromosomas B hasta el presente (Ueshima 1979). *Dysdercus* representa el único género de la familia Pyrrhocoridae en el Nuevo Mundo. Según van Doesburg (1968), este género se originó en el Viejo Mundo y las especies americanas habrían derivado de especies inmigrantes, muy probablemente procedentes de la Región Etiópica. Desde el punto de vista sistemático, sólo seis especies de *Dysdercus* han sido citadas en la Argentina: *D. albofasciatus*, *D. chaquensis*, *D. immarginatus*, *D. peruvianus*, *D. ruficollis* y *D. wilhelminae*, constituyendo los especímenes de *D. imitator* capturados en el Parque Nacional Iguazú (provincia de Misiones) e incluidos en el presente estudio, la primera cita de esta especie para la entomofauna de la Argentina.

En la familia Rhopalidae sólo 24 especies han sido analizadas citogenéticamente hasta el presente, siendo  $2n=13$  el número modal de esta familia. Del total de especies estudiadas seis pertenecen a la subfamilia Serinethinae y se caracterizan por poseer un complemento cromosómico diploide  $2n=13$ , un par de cromosomas *m* y un sistema cromosómico de determinación del sexo  $X0/XX$ . Dentro del género *Jadera* (Serinethinae), los datos citogenéticos disponibles son escasos en relación con el número de especies descriptas desde el punto de vista

sistemático. Con respecto a los complementos cromosómicos diploides de *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta*, éstos fueron descritos a partir de especímenes de poblaciones procedentes de Texas (USA) y de Brasil, respectivamente (Porter 1917, Piza 1946b), y los resultados descritos en el presente trabajo de Tesis concuerdan con las descripciones originales de ambas especies (PUBLICACION III).

### Mecanismos de Evolución del Cariotipo

Los cariotipos evolucionan a través de alteraciones numéricas y estructurales. Si ambos miembros de un par de cromosomas homólogos poseen la misma alteración, el individuo es homocigota para esa alteración, mientras que si un cromosoma presenta la alteración y el otro es normal, el individuo es heterocigota para dicha alteración (Appels et al. 1998). La presencia de un polimorfismo cromosómico dentro de una especie es usualmente considerado por los citogenetistas como un fenómeno independiente no asociado con el proceso de especiación (King 1993). En términos generales, en la evolución de un cariotipo un cambio cromosómico aparece primeramente en condición heterocigota. Si esta alteración posee efectos deletéreos puede existir como un polimorfismo transitorio durante un período corto de tiempo. En contraste, si este polimorfismo transitorio confiere alguna ventaja adaptativa o es selectivamente neutro, puede permanecer en la población durante períodos de tiempo más largos antes de pasar a condición homocigota y finalmente fijarse en la población (White 1973, King 1993). En las poblaciones naturales de organismos con cromosomas holocinéticos los polimorfismos cromosómicos, e incluso la aparición de individuos heterocigotas para alguna alteración cromosómica, ocurren con baja frecuencia.

Los estudios citogenéticos en Heteroptera han revelado la existencia de unos pocos casos de variaciones numéricas intraespecíficas debidas a diferencias en el número de autosomas o de cromosomas sexuales y, a veces, a la presencia de cromosomas supernumerarios. En cuanto a las variaciones numéricas consistentes en la presencia de cromosomas supernumerarios en Heteroptera, en general se refieren a la aparición de uno o dos individuos en las muestras analizadas (White 1973, Ueshima 1979).

Las fusiones y fragmentaciones son las alteraciones cromosómicas más frecuentemente descritas en Heteroptera; muchos citólogos consideran que dichos reordenamientos desempeñan un papel sumamente importante en la evolución cariotípica de este grupo (Ueshima 1979). En los sistemas monocéntricos las fusiones y fragmentaciones cromosómicas llevan

implícita la pérdida o ganancia de centrómeros para mantener la estabilidad del nuevo complemento cromosómico (Appels et al. 1998). Esta limitación no se aplica a los sistemas con cromosomas holocinéticos en los cuales los nuevos cromosomas surgidos por una fusión o producto de una fragmentación portan la información indispensable para orientarse y migrar correctamente durante las divisiones celulares. No obstante, la fragmentación de un cromosoma holocinético requiere la reparación de los extremos fragmentados del cromosoma en cuestión, lo que garantiza su estabilidad (Appels et al. 1998).

Entre las especies estudiadas de Coreidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Largidae se han encontrado ejemplos de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, las cuales se discuten a continuación.

Considerando que el número modal de la familia Coreidae es  $2n = 21 = 18 + 2m + X_0$ , el número cromosómico diploide menor presente en las tribus Coreini, Gonocerini y Micitini (Coreinae) pudo haberse originado a partir de especies con números cromosómicos mayores a través de una fusión autosómica (Dutt 1957). Este mecanismo de fusión cromosómica, que ha tenido lugar en la evolución de la subfamilia Coreinae, ha sido demostrado en los estudios realizados en cinco especies del género *Cletus* (Gonocerini): *C. bipunctatus* (Manna 1951, Banerjee 1958), *C. pugnator* (Dutt 1957), *C. trigonus*, *C. punctulatus* (Parshad 1957b), *C. hoplomachus*, *C. rusticus* y *C. trigonus* (Toshioka 1935). Todas estas especies se caracterizan por presentar  $2n = 18 = 14 + 2m + X_1X_2$  y dos pares de autosomas de gran tamaño, los cuales están ausentes en *Cletomorpha hastata*, otra especie de la misma tribu con un complemento cromosómico diploide  $2n = 22 = 18 + 2m + X_1X_2$  (Manna 1951). Por consiguiente se sugiere que, teniendo en cuenta los hallazgos incluidos en el presente estudio, el complemento cromosómico diploide de *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer* ( $2n = 19 = 16 + 2m + X_0$ ) se habría originado por una fusión autosómica dado que se distinguen tres pares de autosomas mayores.

La familia Lygaeidae *sensu lato* se caracteriza citogenéticamente por poseer cromosomas de tamaño relativamente grande. No obstante, sólo en las subfamilias Henestarinae, Chauliopininae, Orsillinae y Blissinae ha sido mencionada la presencia de un par autosómico extraordinariamente mayor. En Orsillinae y Blissinae se encontró este cromosoma extremadamente grande en todas las especies con un complemento cromosómico  $2n = 14$ , mientras que está ausente en las especies con un número diploide mayor (usualmente 16). Como consecuencia, Ueshima y Ashlock (1980) propusieron una fusión autosómica para explicar el origen de este singular par autosómico. En las especies de *Lygaeus* analizadas citogenéticamente los cromosomas no difieren mucho en tamaño, siendo los cromosomas sexuales los más pequeños del complemento. Sin embargo, se han descripto diferencias más o menos conspicuas entre estas especies; por ejemplo, el cromosoma



sexual Y de *Lygaeus equestris* es diminuto (Schachow 1932, Pfaler-Collander 1941) y el complemento cromosómico diploide de *L. simulus* es el más alto ( $2n=22$ ), distinguiéndose entre los bivalentes autosómicos dos más grandes, los restantes ocho pares de autosomas similares entre sí, y los cromosomas sexuales X e Y de tamaño similar (Parshad 1957a). Ueshima y Ashlock (1980) han sugerido que el número cromosómico diploide modal para la subfamilia Lygaeinae es 14 ( $12+XY$ ). Considerando este  $2n$  como el complemento cromosómico atávico de *Lygaeus*, el complemento cromosómico de *L. simulus* debió haberse originado a través de la fragmentación de cuatro pares de autosomas.

Los resultados obtenidos en este trabajo en *Lygaeus alboornatus*, por otro lado, muestran que esta especie posee el número cromosómico diploide más bajo mencionado hasta el presente en la subfamilia Lygaeinae. Sobre la base de la presencia de un par autosómico notablemente grande en *L. alboornatus*, parece muy probable que su cariotipo se hubiese originado a partir del complemento atávico a través de una fusión autosómica (PUBLICACION IV). Hasta el presente, permanece aún desconocido si el par autosómico marcadamente mayor observado en *L. alboornatus* se corresponde con el presente en las especies pertenecientes a Henestarinae, Chauliopinae, Orsillinae y Blissinae. No obstante, se sugiere que tanto las especies de esas cuatro subfamilias como *L. alboornatus* compartirían muy probablemente ese par autosómico a través de un similar mecanismo de fusión. Un análisis detallado de los cromosomas involucrados en la formación de ese particular par autosómico sería un paso fundamental para comprender este proceso biológico. Asimismo, aun cuando este par autosómico marcadamente mayor no sea homólogo en las especies de estas cinco subfamilias, su formación y conservación en el complemento cromosómico podría considerarse como una condición selectivamente neutra o, por lo menos, una característica meiótica no perjudicial para las especies (PUBLICACION IV).

Dentro de Pyrrhocoridae, de las 11 especies de *Dysdercus* analizadas citogenéticamente hasta el presente, siete pertenecen al Viejo Mundo y cuatro corresponden al Nuevo Mundo (Ueshima 1979, Manna & Deb-Mallick 1981, Manna 1984, Kuznetsova 1988). Todas las especies del Viejo Mundo comparten un mismo número cromosómico diploide  $2n=16/18$  y un mismo sistema cromosómico de determinación del sexo  $X_1X_20/X_1X_1X_2X_2$  (Ueshima 1979, Manna & Deb-Mallick 1981, Kuznetsova 1988). En contraste, los estudios realizados en las especies americanas de *Dysdercus* revelaron diversidad no sólo en el número diploide ( $2n=12$  a  $16$ ) sino también en los sistemas cromosómicos de determinación del sexo ( $X0$ ,  $X_1X_20$  y neo-XY). *Dysdercus chaquensis* (Mola & Papeschi 1997) y *D. ruficollis* (Piza 1947a) tienen el mismo número cromosómico diploide  $2n=13$  ( $12+X0/12+XX$ ), mientras que *D. honestus* (Piza 1947a) presenta  $2n=15$  ( $14+X0/14+XX$ ) y *D.*



*peruvianus* posee el número cromosómico diploide más alto ( $2n = 16 = 14 + X_1X_20/14 + X_1X_1X_2X_2$ ) (Piza 1947a, Mendes 1949, Piza 1951).

Considerando como complemento cromosómico atávico del género *Dysdercus* un número diploide  $2n = 15 = 14 + X0$ , el sistema múltiple de determinación cromosómica del sexo debió haberse originado a través de una fragmentación del cromosoma X original, dando origen al número cromosómico diploide  $2n = 16 = 14 + X_1X_20$ . Ambas condiciones se encuentran en *Dysdercus honestus* (Mendes 1947, Piza 1947b, Mendes 1949, Piza 1951) y en *D. peruvianus* (Piza 1947a, Mendes 1949, Piza 1951), respectivamente. Por otra parte, una fusión autosómica entre dos cromosomas no homólogos podría haber conducido a la reducción en el número cromosómico diploide ( $2n = 13 = 12 + X0$ ), el cual ha sido indicado en *D. chaquensis* (Mola & Papeschi 1997) y en *D. ruficollis* (Piza 1947a) así como en *D. imitator*. Por último, una posterior fusión entre el cromosoma X original y un autosoma tuvo lugar durante la evolución del cariotipo, originando el sistema cromosómico de determinación del sexo neo-XY. Este tipo de neo sistema ha sido descripto en *D. albofasciatus*, que a su vez posee el complemento cromosómico diploide más bajo para el género citado hasta el presente ( $2n = 12 = 10 + \text{neo-XY}$ ) (PUBLICACION II).

### Presencia de Cromosomas Supernumerarios o B

Con respecto a la presencia de cromosomas B o supernumerarios en las especies analizadas en el presente trabajo de Tesis, estos fueron encontrados en *Largus fasciatus* y en *Dysdercus albofasciatus* (PUBLICACION II).

La presencia de un cromosoma B se detectó en 8,89% del total de células meióticas analizadas en un solo individuo de *Largus fasciatus* (Largidae) ( $N^\circ$  total de células = 45). Dado el bajo número de células con dicho cromosoma supernumerario, no fue factible llevar a cabo el estudio de su comportamiento meiótico.

Por otro lado, en cuatro especímenes de la población de *Dysdercus albofasciatus* (Pyrrhocoridae) provenientes del Parque Nacional El Palmar (provincia de Entre Ríos) se observó la presencia de un cromosoma B en un porcentaje de células variado (entre 26,2% y 90,9%, **Tabla 10**). Este cromosoma B presentó un comportamiento meiótico regular, dividiéndose reduccionalmente en anafase I y ecuacionalmente en la segunda división meiótica. Además, se lo observó asociado frecuentemente con los autosomas. Estas observaciones llevan a

sugerir que dicho cromosoma se habría originado a partir de un autosoma por fragmentación (PUBLICACION II).

### Presencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales

En la bibliografía existente sobre alteraciones estructurales en Heteroptera, no se conocen ejemplos de polimorfismos cromosómicos ni de heterocigosis para deficiencias o duplicaciones, y sólo se ha descrito un caso de heterocigosis para una inversión en un mutante espontáneo de *Acanonicus habni* (Papeschi & Mola 1990b). Por otro lado, se han observado translocaciones recíprocas simétricas, asimétricas y complejas como resultado de la irradiación con rayos X en *Euschistus servus*, *E. tristigmus* y *Solubea pugnax* (Pentatomidae) (Hughes-Schrader & Schrader 1961) y en *Oncopeltus fasciatus* (Lygaeidae) (La Chance et al. 1970), mas este tipo de suceso cromosómico no se ha detectado en poblaciones naturales.

Basándonos en los estudios citogenéticos realizados en Heteroptera hasta el presente, se puede concluir que las translocaciones son hechos que ocurren muy raramente; como consecuencia de la heterocigosis para una translocación debería observarse la formación de multivalentes durante la meiosis, lo cual no ha sido descrito. Sin embargo, la ocurrencia de inversiones y duplicaciones de segmentos cortos podría acontecer pero pasar inadvertidas, ya que como los bivalentes presentan generalmente un solo quiasma, si éste estuviera ubicado fuera de la alteración, el desarrollo de la meiosis no se vería afectado.

No obstante, White (1973) ha sugerido que las translocaciones recíprocas tienen potencialmente grandes posibilidades de establecerse en especies con cromosomas holocinéticos, debido a que sus productos son transmisibles en la meiosis. Teniendo en cuenta la frecuencia de las translocaciones recíprocas en los diferentes grupos de organismos con cromosomas holocinéticos, y las consecuencias citológicas y genéticas de este tipo de reordenamiento, se puede concluir que en general existe una fuerte selección negativa, habiendo jugado únicamente un papel importante en la evolución del cariotipo en escorpiones de la familia Buthidae (orden Scorpionida) (Shanahan 1989). Sin embargo, no se podría descartar que las translocaciones hayan ocurrido en la evolución cariotípica de dicho grupo, fijándose por especiación estasipátrida, dado que es difícil su detección en los cromosomas holocinéticos.

Sobre la base de las observaciones realizadas durante el presente trabajo de Tesis, la presencia de un cuadrivalente, cuatro bivalentes y el univalente X (1 IV+4 II+X) en 43% de las células meióticas analizadas de un individuo de *Largus rufipennis* procedente del arroyo Itaembé

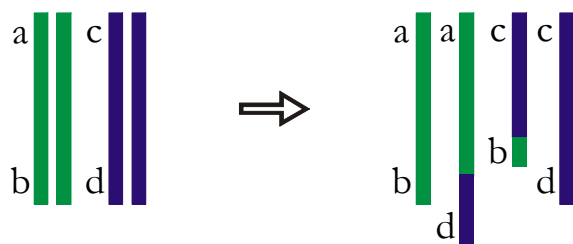
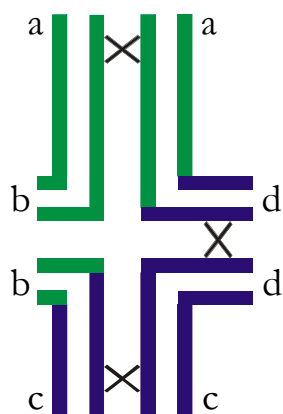
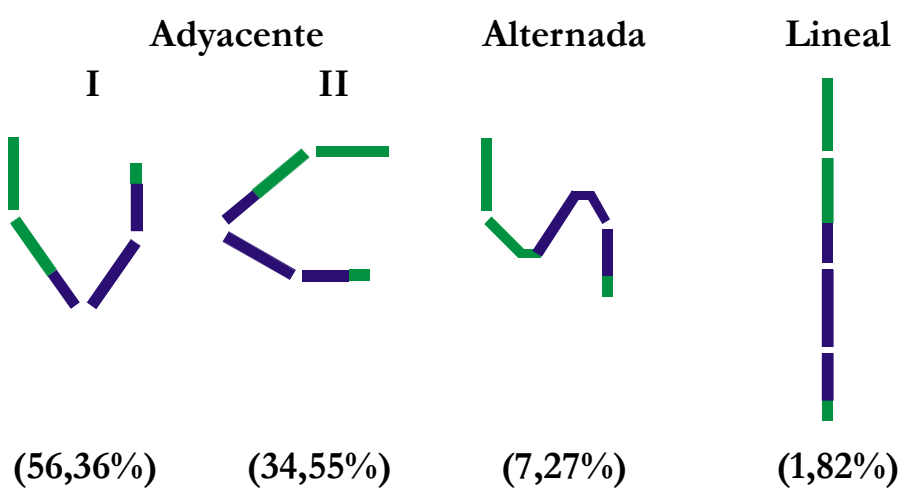
(provincia de Misiones) indica que es heterocigota para una translocación recíproca. Este individuo es portador de una translocación recíproca desigual entre dos cromosomas no homólogos de tamaño mediano, con una de las rupturas localizada en una zona próxima a la región telomérica. Por lo tanto, el resultado de la translocación es un cromosoma grande y otro pequeño, respectivamente (**Figura 41a**) ([PUBLICACION I](#)).

En teoría, un cuadrivalente puede adoptar una configuración en cadena o en anillo dependiendo de la formación de tres o cuatro quiasmas, respectivamente. La configuración del cuadrivalente presente en este individuo ha estado restringida a la forma en cadena, dentro de la cual los cromosomas involucrados han mantenido el mismo orden: pequeño, mediano, grande y mediano. La ausencia absoluta de quiasmas en una determinada región de apareamiento sugiere que esta región debería ser muy pequeña, determinando que sea muy difícil o aun imposible una recombinación en dicha región (**Figura 41b**) ([PUBLICACION I](#)).

Si sólo dos entrecruzamientos tienen lugar en el cuadrivalente y suponiendo que su distribución entre las tres regiones recombinantes es al azar, las configuraciones meióticas esperadas son un trivalente más un univalente, o también dos bivalentes heteromórficos, siendo la frecuencia de la primera configuración dos veces más alta que la de la segunda. Dado que en *L. rufipennis* 54% de las células analizadas presentaron dos bivalentes heteromórficos y 3% mostraron un trivalente más un univalente, se puede concluir que existen sitios de preferencia donde ocurre entrecruzamiento.

Este hecho junto con la localización terminal o subterminal de los quiasmas observados en el resto de los individuos de la población, conduce a sugerir que los entrecruzamientos ocurrirían preferentemente en una única región telomérica, tanto en el cuadrivalente como en los dos pares de cromosomas originales no translocados (**regiones a y c, Figura 41a, b**). Por lo tanto, la recombinación meiótica en el cuadrivalente ocurriría primero en estas áreas originando dos bivalentes heteromórficos. Debido a que la frecuencia media de quiasmas en este individuo es aproximadamente 7 (6,86), el resto de los entrecruzamientos podrían tener lugar en el cuadrivalente (**región d, Figura 41a, b**) o en otro par autosómico, el cual estaría presente como un bivalente en anillo ([PUBLICACION I](#)).

En Heteroptera la actividad cinética durante la meiosis está restringida a una de las dos regiones teloméricas (actividad telocinética); en metafase I los bivalentes se orientan axialmente en la placa ecuatorial y las regiones teloméricas lideran la migración en anafase hacia los polos.

**a: Translocación recíproca desigual****b: Configuración en paquitene****c: Orientación en metafase I****Figura 41.** Origen y orientación del cuadrivalente.

En el cuadrivalente del individuo de *L. rufipennis* sólo dos regiones teloméricas están disponibles para unirse a las fibras del huso y podrían presentar una orientación adyacente adoptando una configuración en "U" (56,36%) con ambas regiones teloméricas dirigidas hacia el mismo polo, o adyacente adoptando una configuración en "C", alternada o lineal con ambas regiones teloméricas dirigidas hacia polos opuestos (34,55%, 7,27% y 1,82%, respectivamente) (**Figura 41c**) (**PUBLICACION I**).

Sin embargo, el cuadrivalente tendría otros sitios de unión a las fibras del huso además de las teloméricas, especialmente en la configuración en "C" y en la alternada. La existencia de sitios alternativos con actividad cinética meiótica ha sido previamente sugerida en Heteroptera para explicar la migración de los bivalentes en anillo ([Camacho et al. 1985](#), [Papeschi & Bidau 1985](#)).

Las observaciones realizadas en *Largus rufipennis* muestran que las orientaciones lineal y adyacente, las cuales representan aproximadamente 93% de las células, dan como resultado gametas no balanceadas debido a duplicaciones o deficiencias genéticas en el individuo heterocigota para la translocación recíproca. Por otro lado, sólo la orientación alternada origina gametas balanceadas. Asumiendo que los bivalentes tienen una orientación al azar, en las células con seis bivalentes la mitad de las gametas estarán balanceadas y la otra mitad no balanceadas. Como consecuencia, los resultados obtenidos en el individuo portador de la translocación sugieren una gran disminución en su fertilidad, lo que hace poco probable que este reordenamiento cromosómico conforme un polimorfismo balanceado o se establezca en la población. El alto porcentaje de células con cuadrivalente estaría favorecido por la alta frecuencia media de quiasmas en la muestra (6,86). Por último, el porcentaje final muy bajo de gametas balanceadas en el individuo heterocigota sería una consecuencia del tipo de meiosis característica de Heteroptera, quiasmática y pre-reduccional con actividad telocinética (**PUBLICACION I**).

### Sistemas Cromosómicos de Determinación del Sexo

En relación con los sistemas cromosómicos de determinación del sexo, la mayoría de las especies de Heteroptera presentan el sistema sexual XY/XX y con menor frecuencia el sistema X0/XX, mientras que los sistemas múltiples de determinación del sexo originados por fragmentación del cromosoma X o del cromosoma Y están presentes en pocas especies. Además de los sistemas simples y múltiples, la presencia de neo sistemas sólo se ha mencionado en *Rhytidolomia senilis* (Pentatomidae), *Lethocerus indicus* y *Lethocerus* sp (Belostomatidae). Si bien se considera al sistema sexual XY/XX como el más común en Heteroptera, los taxa más primitivos

(Dipsocoromorpha, Gerromorpha y Leptopodomorpha) se caracterizan por poseer el sistema X0/XX (Ueshima 1979, Grozeva & Nokkala 1996). Además, este sistema es muy común en los órdenes primitivos de insectos Odonata, Orthoptera, Psocoptera (White 1973) y también en Homoptera, particularmente en Auchenorrhyncha (Halkka 1959). Hasta el presente, todas las familias del infraorden Gerromorpha analizadas citogenéticamente poseen el sistema de determinación del sexo X0/XX, sugiriendo que el sistema sexual XY/XX en Heteroptera derivaría del sistema X0/XX (Ueshima 1979).

En contraposición con esta hipótesis, Nokkala y Nokkala (1983, 1984) sugirieron una interpretación alternativa sobre la base del hallazgo de un cromosoma Y en especies del género *Saldula* (Saldidae), y de la presencia del sistema cromosómico de determinación del sexo XY/XX en las especies estudiadas citogenéticamente de la familia Tingidae y de la familia Dipsocoridae (Grozeva & Nokkala 1996), siendo consideradas estas familias entre las más primitivas de Heteroptera. Esta hipótesis propone que el sistema de determinación del sexo atávico en Heteroptera sería el sistema XY/XX, mientras que el sistema X0/XX sería un sistema derivado del anterior (Grozeva & Nokkala 1996). Además, han sido descriptas variaciones intragenéricas respecto de la presencia/ausencia del cromosoma Y en cinco géneros pertenecientes a diferentes familias (*Microvelia*, Veliidae; *Hydrometra*, Hydrometridae; *Plagiognatus*, Miridae; *Physopelta*, Largidae; *Dicranocephalus*, Stenocephalidae) (Ueshima 1979, Nokkala & Nokkala 1984). Por consiguiente, tanto la presencia del cromosoma Y entre las familias más primitivas de Heteroptera como la existencia de variaciones intragenéricas de los sistemas cromosómicos de determinación del sexo, dispersas entre sus diversas familias, apoyarían la interpretación acerca de que el sistema sexual XY sería el atávico (Nokkala & Nokkala 1984). Nokkala y Nokkala (1984) han sugerido que el cariotipo primitivo de Heteroptera habría incluido a ambos cromosomas sexuales (X e Y) y que, independientemente del taxón, todos los sistemas de determinación sexual X0/XX serían el resultado de la pérdida primaria del cromosoma Y y no producto de derivaciones secundarias.

En cuanto a la evolución de los sistemas cromosómicos múltiples de determinación del sexo en Heteroptera, es aceptado citogenéticamente que se han desarrollado por fragmentación a partir del sistema de determinación del sexo XY/XX (Ueshima 1979).

Sin embargo, es necesario tener presente que los taxa hasta ahora estudiados no representan una muestra significativa del grupo completo, ya que la información citogenética es muy rica en taxa más avanzados y pobre en taxa primitivos. Por lo tanto, se necesita más información, particularmente de los taxa supuestamente primitivos, antes de inferir toda conclusión final al respecto (Ueshima 1979).

Los sistemas sexuales múltiples en Heteroptera se destacan por el hecho de que éstos generalmente no están acompañados de una disminución en el número de autosomas. Por tal motivo, ha sido sugerido que los sistemas múltiples en Heteroptera se originaron muy probablemente por simple fragmentación de un cromosoma sexual original (Payne 1909, Schrader 1947, Ueshima 1979). De este modo, los sistemas sexuales múltiples  $X_nY$ ,  $XY_n$  y  $X_nY_n$  derivarían de un sistema XY por fragmentación del cromosoma X y/o del cromosoma Y. Los sistemas  $X_n0$  se pueden originar a partir de un sistema  $X_nY$  por pérdida del cromosoma Y, o a partir de un sistema  $X0$  por fragmentación del cromosoma X atávico.

Con respecto a los neo-sistemas cromosómicos de determinación del sexo, éstos se han descrito en una gran cantidad de especies animales y vegetales. Estos sistemas cromosómicos se habrían originado, en la gran mayoría de los casos, por una fusión céntrica o una translocación recíproca entre uno de los cromosomas sexuales atávicos X o Y y un o varios autosomas (A). En el caso de una fusión o translocación X-A, el autosoma homólogo (A') se transforma en neo-Y y está limitado a los individuos masculinos. White (1973) ha diferenciado en ortópteros dos tipos de sistemas neo-XY según la homología observada entre el neo-X y el neo-Y durante la meiosis. En el primer grupo el neo-Y se aparea en toda su longitud con la parte autosómica del neo-X. Sin embargo, en la mayoría de los casos reportados las regiones apareantes están limitadas a la zona distal. Se ha postulado que ambos tipos son los extremos de una espectro continuo en el que la heterocromatinización progresiva del neo-Y resultaría en una pérdida de homología (Cardoso & Dutra 1979). En términos generales, el análisis comparativo del sistema neo-XY de especies relacionadas indica que estos cromosomas evolucionan hacia un aumento de la diferenciación genética entre los nuevos cromosomas sexuales (Charlesworth & Wall 1999).

Se han postulado varios modelos para explicar el supuesto valor adaptativo de estos sistemas y su evolución futura. El primer modelo propone que por deriva génica la fusión o translocación recíproca X-autosoma (o Y-autosoma) se esparce en la población reemplazando al cariotipo ancestral. Un segundo modelo plantea que uno o más loci se mantendrían polimórficos por selección, con efectos sexualmente antagonistas sobre la aptitud, de manera tal que ciertos alelos estarían favorecidos en machos y otros en hembras. Esto llevaría a una ventaja adaptativa de la fusión o translocación X-A o Y-A, cuando el locus o loci seleccionados quedaran situados en proximidad al factor determinante del sexo. Finalmente, un tercer modelo se refiere a la evolución de la heterocigosis permanente para el rearreglo y heterocigosis para los alelos que afectan la aptitud. La existencia de heterosis para dichos alelos generaría una ventaja selectiva (Charlesworth & Wall 1999).



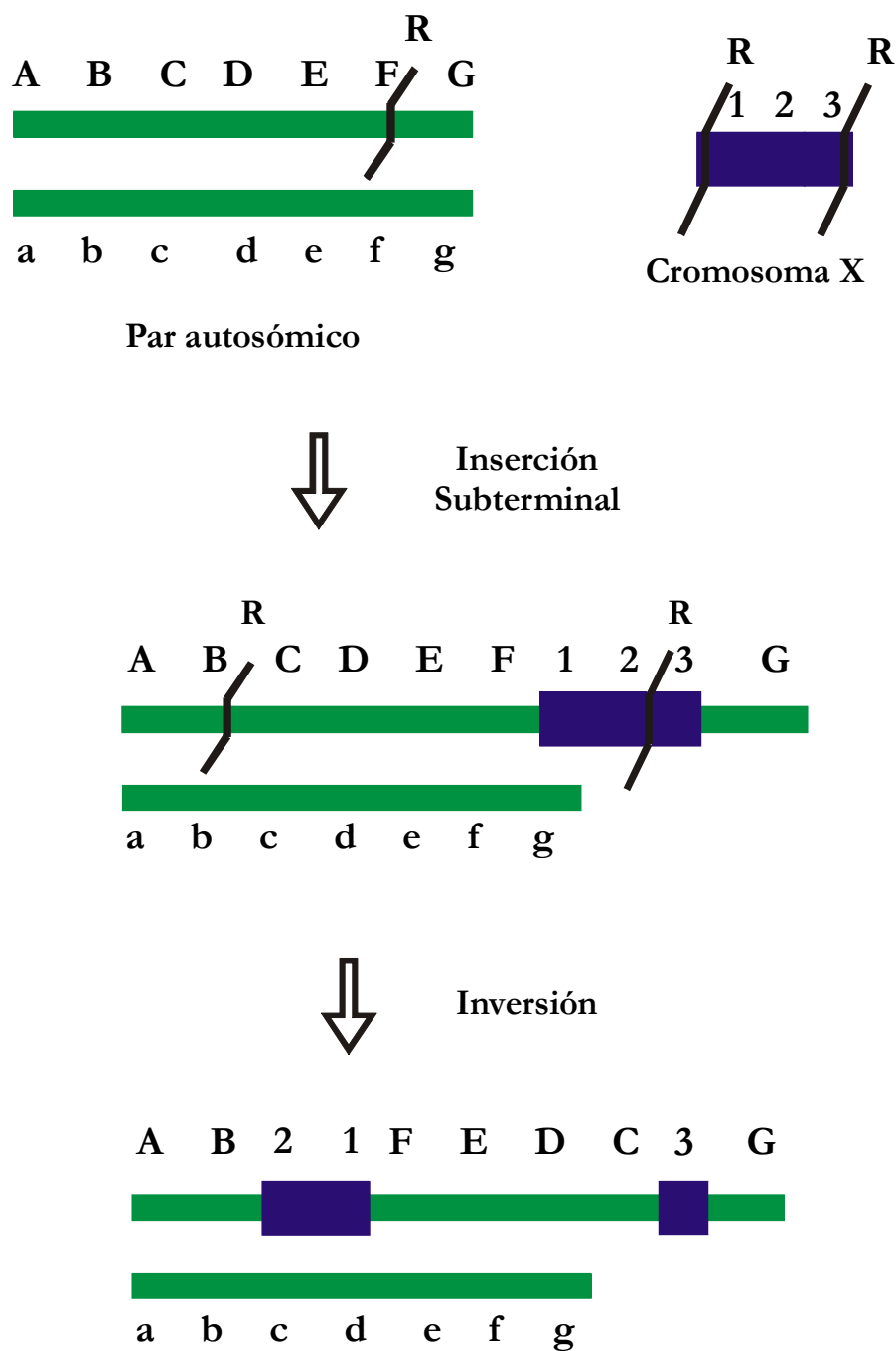
Entre los ortópteros acridoideos, el sistema neo-XY ha aparecido de manera recurrente e independiente en la mayoría de las familias (Hewitt 1979). En la mayoría de los casos, la formación del neo-sistema se atribuye a una fusión céntrica entre el cromosoma X y un autosoma, aunque en algunos casos el origen propuesto es más complejo. En *Dichroplus vittatus*, por ejemplo, Bidau & Martí (2001) han propuesto que el neo-sistema se habría originado por una fusión en tandem entre dos cromosomas X telocéntricos atávicos seguido por otra fusión en tandem con el bivalente pequeño megamérico, y una posterior inversión pericéntrica del neo-X; el autosoma homólogo restante se convertiría en el cromosoma neo-Y.

Entre los insectos con cromosomas holocinéticos, los neo-sistemas cromosómicos de determinación del sexo se han descrito en Odonata. En 95% de las especies de odonatos el sistema cromosómico de determinación del sexo es X0/XX, siendo el macho el sexo heterogamético. El otro sistema descrito es el neo-XY, el cual se halla presente en las restantes especies del orden analizadas citogenéticamente, y presenta una distribución heterogénea entre las diferentes familias. Ciertos géneros de los subórdenes Zygoptera y Anisoptera presentarían una mayor predisposición para su ocurrencia, pero la formación de neo-sistemas no parece estar relacionada con la filogenia ni con taxones superiores a género (Mola 1992).

En Heteroptera, la presencia de neo-sistemas sólo se había descrito en tres especies del orden. Con respecto al origen de los neo-sistemas encontrados en *Rhytidolomia senilis* (Pentatomidae) (Schrader 1940), *Lethocerus indicus* (Chickering 1927a, b) y *Lethocerus* sp (Belostomatidae) (Chickering & Bacorn 1933), éstos surgieron por una fusión de los cromosomas X e Y atávicos con un par de autosomas, originando un tipo particular de neo sistema, el sistema neoX-neoY.

Cabe destacar que el análisis citogenético de *Dysdercus albofasciatus* reveló la presencia de un sistema sexual neo-XY, el cual es original para el género así como para la familia Pyrrhocoridae, e incluso para Heteroptera en virtud de su origen (PUBLICACION II).

Sobre la base de las observaciones realizadas en el presente trabajo de Tesis, el neo-sistema de *Dysdercus albofasciatus* habría tenido un origen complejo el cual se esquematiza en la **Figura 42**. Al respecto se postula que, en una primera etapa se habría producido una inserción subterminal del cromosoma X atávico en un autosoma, formando un neo-X. Posteriormente, habría acontecido una inversión que involucra la mayor parte del neo-X, incluyendo al X atávico. Esta inversión traería aparejado la división del cromosoma X en dos segmentos de tamaño diferente ubicados en ambos extremos del autosoma (PUBLICACION II).



**Figura 42.** Origen del sistema cromosómico de determinación del sexo neo-XY en *Dysdercus albobfasciatus*. R= ruptura.

Con respecto al tipo de meiosis, si bien los cromosomas sexuales en Heteroptera, tanto en los sistemas cromosómicos de determinación del sexo simples como en los múltiples, se dividen postreduccionalmente, el bivalente sexual en *Dysdercus albobfasciatus* presenta una meiosis de tipo

pre-reduccional, presentando un comportamiento meiótico similar al descripto para los autosomas (PUBLICACION II).

Dentro de la familia Rhopalidae, en los especímenes analizados tanto de *Jadera haematoloma* como de *J. sanguinolenta* se detectó la presencia de un polimorfismo sexual en relación con el tamaño del cromosoma X (PUBLICACION III). Hay dos explicaciones posibles para elucidar el origen de este polimorfismo: por fragmentación de un cromosoma X atávico de gran tamaño o por adición de heterocromatina en un primitivo cromosoma X de tamaño pequeño. La fragmentación del cromosoma X daría origen a un sistema múltiple de determinación cromosómica del sexo, el cual no ha sido descripto en el género *Jadera* hasta el presente. Por consiguiente, sería más probable que la diversidad observada en el tamaño del cromosoma X se deba a la adición de heterocromatina durante la evolución (PUBLICACION III).

### Presencia/Ausencia del Estadio Difuso

Del total de las especies analizadas en el presente trabajo, sólo se ha observado la presencia de un estadio difuso en especímenes de *Athaumastus haematicus*, *Phthia picta*, *Leptoglossus impictus* (Coreidae), *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae), *Dysdercus chaquensis*, *D. imitator* (Pyrrhocoridae), *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* (Rhopalidae). Durante la profase meiótica temprana, inmediatamente después de paquitene, la célula entra en un estadio difuso cuyas características y duración dependen de las especies. Este estadio constituye una característica general de la meiosis de Heteroptera (Ueshima 1979), al igual que de otros organismos, durante el cual la cromatina se descondensa y el núcleo adquiere el aspecto del de una célula interfásica (Klásterská 1974, 1976, 1977, 1978). Según Wilson (1925), el estadio difuso debería considerarse como un diplotene altamente modificado en el cual, aunque la dualidad característica de los bivalentes diploténicos no sería evidente, persistiría oculta de algún modo.

En *Athaumastus haematicus* y *Phthia picta* los bivalentes autosómicos se descondensan aunque no completamente, y se observan regiones heteropicnóticas positivas dispersas en el núcleo, en tanto que en *Leptoglossus impictus* únicamente se distingue al cromosoma X heteropicnótico positivo. En el caso de *Lygaeus alboornatus* los bivalentes autosómicos se descondensan completamente, mientras que los cromosomas sexuales X e Y permanecen heteropicnóticos positivos y pueden estar separados o próximos uno de otro (PUBLICACION IV). En *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* los bivalentes autosómicos también se descondensan completamente

y sólo es posible identificar claramente al cromosoma X y, menos frecuentemente a los cromosomas *m*, por ser heteropicnóticos positivos (PUBLICACION III).

Otra de las especies analizadas con estadio difuso es *Dysdercus imitator*, que se caracteriza por un aumento importante del tamaño celular y la descondensación completa de los bivalentes autosómicos, permaneciendo condensado y heteropicnótico positivo el cromosoma X. Sin embargo, cabe señalar que ese notable incremento de tamaño no se circunscribe sólo al estadio difuso, sino que persiste a lo largo de los siguientes estadios meióticos.

En el análisis de la meiosis de *Dysdercus chaquensis* se observó la ausencia del estadio difuso en todos los especímenes analizados de la población endocriada, mientras que los ejemplares de la población natural se caracterizaron por la presencia de este estadio a continuación de paquitene (PUBLICACION V). Basándose en la existencia de un gran nucléolo usualmente asociado al cromosoma X en la mayoría de los espermatoцитos durante el estadio difuso y a lo sugerido previamente (Klásterská 1974, 1976, 1977, 1978), la presencia de dicho estadio en todos los especímenes analizados de la población natural estaría directamente relacionada con una intensa actividad transcripcional (PUBLICACION V).

Basándose en el estudio de la bionomía de *Dysdercus albofasciatus*, Stadler y colaboradores (1987) han sugerido que el tiempo de reproducción, el desarrollo ninfal, la migración y la diapausa de las especies de *Dysdercus* dependen básicamente de la dieta, temperatura ambiental, humedad relativa, precipitaciones y fotoperíodo bajo los cuales los individuos se desarrollan. De esta manera, a partir del estudio de Stadler y colaboradores se sugiere que la ausencia del estadio difuso en los ejemplares de la población endocriada analizada en el presente trabajo de Tesis podría estar relacionada con la uniformidad de las condiciones ambientales bajo las cuales fueron criados durante 7 años. Además, el estadio difuso en estos ejemplares podría estar ausente debido a la falta de requerimiento de una intensa actividad biosintética llevada a cabo durante dicho estadio. En concordancia con esta posible hipótesis, se podría sugerir que la presencia de este estadio en los especímenes de la población natural estaría relacionada con las condiciones ambientales variadas y posiblemente desfavorables bajo las cuales estos individuos se desarrollan (PUBLICACION V).

Estos resultados representan la primera evidencia citogenética de la ausencia de un estadio meiótico, como el estadio difuso, en una población mantenida bajo condiciones uniformes (PUBLICACION V). Dada la imposibilidad de obtener más ejemplares de la población endocriada de *Dysdercus chaquensis* al no encontrarse disponible en la actualidad, sería conveniente llevar a cabo un análisis comparativo simultáneo de poblaciones naturales y endocriadas en otras especies de Heteroptera, en las cuales se haya mencionado la presencia del estadio difuso en la

meiosis de poblaciones naturales. De esta manera, se podría confirmar o rechazar la hipótesis planteada en torno a la ausencia de este estadio difuso en relación con la uniformidad de las condiciones ambientales, como así también, revelar su importancia como un estadio de intensa actividad biosintética.

Otro aspecto a destacar del estadio difuso es que se lo ha relacionado con un período de intenso crecimiento celular y de intensa actividad transcripcional, esto se evidencia además por la presencia de múltiples nucléolos (Klásterská 1977). Se ha sugerido que el ARN necesario para la formación de estos nucléolos probablemente sería sintetizado durante este estadio (Klásterská 1977). En la mayoría de las especies del phylum Arthropoda los nucléolos se desorganizan en diplotene o diacinesis, no siendo detectadas las regiones organizadoras nucleolares (NORs) reveladas con sales de plata (Ag-NORs) a partir de metafase I hasta telofase I. Los Ag-NORs vuelven a estar presentes en las espermátidas tempranas, indicando la recuperación de la función transcripcional del ARN ribosomal y finalmente desaparecen en las espermátidas tardías. En la mayoría de las especies de Heteroptera, en particular, puede detectarse un único nucléolo desde la profase meiótica temprana hasta el estadio difuso y luego se desorganiza durante diplotene o, a lo sumo, en diacinesis. Sin embargo, han sido descriptas algunas excepciones a este comportamiento general. En *Asellus aquaticus* (Isopoda) los Ag-NORs fueron detectados durante toda la espermatogénesis y, por ende, estaban activos en todos los estadios meióticos (Di Castro et al. 1983). En *Callicrania seoanei* (Orthoptera), no sólo los Ag-NORs fueron revelados durante ambas divisiones meióticas, sino también pequeños nucléolos y cuerpos prenucleolares, dispersos entre los cromosomas, fueron observados desde intercinesis hasta prometafase II (Santos et al. 1987). En *Triatoma brasiliensis* y *T. sordida* (Heteroptera, Reduviidae), los Ag-NORs han sido detectados hasta metafase I (García Tavares y Vilela de Azeredo-Oliveira 1997). Por último, en *Carlisis wahlbergi* (Heteroptera, Coreidae), la presencia de nucléolos semi-persistentes fueron identificados hasta metafase II (Fossey y Liebenberg 1995), mientras que en *Acanthocoris sordidus* (Heteroptera, Coreidae) y *Coptosoma punctissimum* (Heteroptera, Plataspidae) el nucléolo fue detectado en las placas metafásicas de los espermátocitos primarios y secundarios (Yosida 1950). Asimismo, teniendo en cuenta que el tamaño del nucléolo está relacionado con la actividad biosintética de la célula, el tamaño y el número de nucléolos o cuerpos prenucleolares dependerían de las características funcionales de la célula y podrían reflejar diferencias metabólicas y funcionales (García Tavares y Vilela de Azeredo-Oliveira 1997).

El análisis citogenético de *Dysdercus imitator* mediante la técnica de impregnación argéntica reveló la presencia de varios cuerpos prenucleolares a lo largo de toda la meiosis. Basándose en que la descondensación de los cromosomas y la presencia de nucléolos en el citoplasma durante

el estadio difuso estarían relacionados con una intensa actividad transcripcional (Klásterská 1977), la presencia de este estadio en *D. imitator* parece adquirir una importancia considerable dada las evidencias citogenéticas observadas. La persistencia de los nucléolos y de los cuerpos prenucleolares observada a lo largo de todos los estadios meióticos en *Dysdercus imitator* podrían estar relacionados con una intensa actividad transcripcional a fin de producir ARN ribosomal requerido para la espermiogénesis. Asimismo, la posibilidad de que esos niveles muy altos de transcripción de ARN ribosomal estuvieran relacionados con niveles anormalmente altos de síntesis debido a razones aún desconocidas, no puede ser desestimada. Se requieren nuevos estudios con el objeto de tratar de dilucidar este comportamiento tan peculiar del nucléolo en la meiosis de *D. imitator*.

### Cromosomas *m*

Hasta el presente, la presencia de un par de cromosomas *m* ha sido descripta en catorce familias de Heteroptera (Ueshima 1979). El comportamiento meiótico de estos cromosomas *m* es esencialmente similar en todas las especies estudiadas, ya que durante cigotene experimentan una falla en el apareamiento o asinapsis, permaneciendo como univalentes a lo largo de la profase meiótica, y en metafase I se aproximan para formar un pseudobivalente, asegurando su segregación regular (White 1973, Ueshima 1979).

Con respecto a las familias Coreidae y Rhopalidae, todas las especies descriptas citogenéticamente presentan un par de cromosomas *m*. Por ejemplo en *Archimerus calcarator* y *Pachylis gigas* los cromosomas *m* son extremadamente pequeños, mientras que en *Protenor belfragei*, *Leptoglossus phyllopus* y *Anasa tristis* son mayores (Wilson 1905a, b, 1909b, c, 1911).

En el presente trabajo de Tesis, las especies de Coreidae y Rhopalidae analizadas también se caracterizan por poseer un par de cromosomas *m*. El comportamiento de estos cromosomas en *Athaumastus haematicus*, *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer*, *Leptoglossus impictus*, *Phthia picta* (Coreidae), *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* (Rhopalidae) es esencialmente similar. En todas las especies son heteropicnóticos positivos durante la profase meiótica temprana, tornándose negativos en diacinesis en *A. haematicus*, *H. bitriangulifer bitriangulifer* y *L. impictus*, en metafase I en *P. picta*, y en diplotene tardío en ambas especies de *Jadera*. A partir de diacinesis se aproximan para formar un pseudobivalente en metafase I. El par de cromosomas *m* presente en estas especies se caracteriza por una meiosis de tipo pre-reduccional (PUBLICACION III).

En general los bivalentes autosómicos son quiasmáticos, salvo en unas pocas especies (Nokkala y Grozeva 2000), mientras que los cromosomas sexuales y los cromosomas *m* son aquíasmáticos, comportándose como univalentes (Ueshima 1979, González-García et al. 1996, Suja et al. 2000). Cuando los bivalentes autosómicos presentan un único quiasma, en metafase I se orientan con sus ejes longitudinales paralelos al huso polar, dividiéndose reduccionalmente en anafase I y ecuacionalmente en anafase II.

### Arquitectura de la Placa Metafásica

Con respecto a la arquitectura de la placa metafásica, en Heteroptera los autosomas tienden a formar un huso hueco en ambas divisiones meióticas, con los cromosomas sexuales y los cromosomas *m*, cuando están presentes, localizados en una posición determinada en relación con los autosomas. Esta arquitectura metafásica puede diferir entre familias, e incluso entre subfamilias, pero es constante en las especies.

Así vemos que en ambas especies estudiadas de Largidae, *Largus fasciatus* y *L. rufipennis*, los autosomas se disponen formando un anillo y el univalente sexual X se ubica fuera de él en las dos placas metafásicas (PUBLICACION I).

En la metafase I de *Dysdercus chaquensis*, *D. ruficollis* y *D. imitator* (Pyrrhocoridae) los bivalentes autosómicos se disponen en el plano ecuatorial adoptando una configuración en anillo, mas se observan diferencias con respecto a la ubicación del cromosoma X. En las dos primeras se sitúa en el centro del anillo y en la tercera puede localizarse en el centro o fuera de él. En relación con la metafase II, en *D. chaquensis* el cromosoma X se encuentra en el centro del anillo formado por los autosomas; *D. imitator* y *D. ruficollis* presentan la misma configuración, en la cual el univalente X se ubica fuera de la placa ecuatorial. En el caso de *Dysdercus albofasciatus* en ambas placas metafásicas los autosomas, junto con el neo-XY, se disponen en la placa ecuatorial formando un anillo (PUBLICACIONES II, V).

En presencia de cromosomas *m* en la familia Coreidae se observa que en *Athaumastus haematicus* el pseudobivalente *m* se ubica en el centro del anillo formado por los bivalentes autosómicos y el univalente X en metafase I, y en *Hypselonotus bitriangulifer bitriangulifer*, *Leptoglossus impictus* y *Phthia picta* este pseudobivalente también se encuentra en el centro del anillo, pero sólo formado por los bivalentes autosómicos, dado que el cromosoma X se ubica generalmente por fuera de éste. Con respecto a la metafase II, *A. haematicus* presenta la misma configuración que en metafase I. En *P. picta* los autosomas se disponen formando un anillo y tanto el cromosoma X



como el *m* no forman parte de él; tanto en *H. bitriangulifer bitriangulifer* como en *L. impictus* la arquitectura de la placa metafásica no es regular, aunque el cromosoma *m* de la primera especie y el X de la segunda se encuentran a menudo en el centro, y fuera del grupo autosómico, respectivamente.

En la metafase I de ambas especies de Rhopalidae analizadas, *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta*, el pseudobivalente *m* se localiza en el centro del anillo formado por los bivalentes autosómicos y el univalente X, mientras que en metafase II el X siempre se ubica fuera del anillo formado por los autosomas y el cromosoma *m* no muestra una posición definida, pudiendo estar tanto en el centro del anillo como formando parte de él (PUBLICACION III).

En *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae) se observa la disposición característica de los taxa de Heteroptera que no poseen cromosomas *m* y presentan el sistema de determinación del sexo XY. En metafase I ambos cromosomas sexuales se orientan lado a lado y se ubican en el centro del anillo formado por los bivalentes autosómicos; en metafase II los cromosomas sexuales X e Y se aproximan y se asocian para formar un pseudobivalente, el cual se ubica en el centro del anillo formado por los autosomas (PUBLICACION IV).

### Frecuencia y Distribución de Quiasmas

En general, se ha aceptado como regla que la mayoría de las especies de Heteroptera poseen un quiasma por bivalente (Ueshima 1979, Manna 1984). La presencia de bivalentes en anillo no siempre es fácil de determinar debido al tamaño pequeño de los cromosomas, a la escasez de células en diplotene y al alto grado de condensación de la cromatina en diacinesis tardía y en metafase I. Sin embargo, la presencia de bivalentes con dos quiasmas ha sido recientemente mencionada por otros autores en especies de Heteroptera tales como *Largus rufipennis* (Largidae) (Mola y Papeschi 1993), *Nezara viridula* (Pentatomidae) (Camacho et al. 1985), *Adamanotus uncotibialis* (Jacobs y Liebenberg 2001), *Dichelops furcatus*, *Dinchoris prolineatus*, *Loxa deducta*, *Piezodorus guildinii* y *Proxys albopunctulatus* (Rebagliati et al. 2001), entre otras.

Por otro lado, dado que en la meiosis los cromosomas holocinéticos de Heteroptera se comportan como cromosomas telocinéticos, los bivalentes en anillo deberían presentar ciertas dificultades en su fijación a las fibras del huso. Si bien aun es incierto el lugar de unión de las fibras del huso cuando ambos extremos cromosómicos del bivalente están involucrados en la formación de quiasmas, en *Largus rufipennis* (Largidae) y en *Belostoma oxyurum* (Belostomatidae) (Mola y Papeschi 1993) se ha descripto que uno de los dos quiasmas del bivalente en anillo se libera primero, dejando libre a una de las regiones teloméricas para unirse a las fibras del huso

(Mola y Papeschi 1993). De este manera, los bivalentes autosómicos adoptan la forma de V antes de quedar orientados axialmente. Asimismo, en estudios previos realizados en *Nezara viridula* (Pentatomidae), Camacho y colaboradores (1985) sugirieron que la actividad cinética en los bivalentes con dos quiasmas probablemente involucraría a otros sitios más que a los extremos cromosómicos.

El análisis citogenético realizado en el presente estudio a partir de ejemplares de *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae), *Dysdercus imitator* (Pyrrhocoridae), *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* (Rhopalidae) contribuye a mostrar que la frecuencia de bivalentes en anillo sería mucho más alta que la originalmente sugerida. No obstante, no fue factible analizar el comportamiento meiótico de estos bivalentes y, por ende, sugerir cuales sitios del bivalente estarían involucrados en la unión a las fibras del huso (PUBLICACIONES III, IV).

A pesar del bajo número de especímenes analizados de *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae), las observaciones realizadas revelan la presencia de células hasta con dos bivalentes en anillo en diacinesis-metafase I, siendo el bivalente mayor el que con mayor frecuencia presenta dos quiasmas terminales (PUBLICACION IV).

Del mismo modo, los resultados obtenidos en *Dysdercus imitator* evidencian una alta frecuencia de bivalentes con dos quiasmas en diacinesis-metafase I. A partir de este análisis se pone de manifiesto claramente que 72% de los especímenes de la población se espera presenten una frecuencia media de quiasmas entre 7,00 y 8,00. En otras palabras, es importante destacar la presencia de uno o dos bivalentes en anillo por célula.

Por otro lado, en las descripciones previas de *Jadera haematoloma* (Porter 1917) y *J. sanguinolenta* (Piza 1946b), los autores no mencionan la presencia de bivalentes autosómicos en anillo en diacinesis-metafase I. No obstante, la presencia de dos quiasmas en algunos pares autosómicos se puede observar en las figuras originales de dichos trabajos (Porter 1917, Piza 1946b). Las observaciones resultantes del análisis citogenético de las poblaciones de *J. haematoloma* y *J. sanguinolenta* del presente estudio, destacan la presencia de hasta cuatro bivalentes en anillo con dos quiasmas terminales, siendo el bivalente autosómico mayor el más propenso a adoptar esta configuración (PUBLICACION III).

### Presencia de Univalentes

La presencia de univalentes dentro de una especie puede tener varias causas, tanto genotípicas como ambientales, mas el/los mecanismo/s involucrados en su formación

permanecen aun desconocidos. La formación del complejo sinaptonémico se inicia en múltiples sitios en el interior del par de cromosomas homólogos, dentro de los cuales existen centros de sinapsis primarios y secundarios. La sinapsis primaria comienza en las regiones teloméricas, congregadas en una zona del núcleo. Además, la estructura cromosómica puede, a su vez, afectar el inicio de la sinapsis (Appels et al. 1998). Entre las causas genotípicas, la presencia de univalentes autosómicos podría deberse a una asinapsis, i.e., falla en la formación primaria del complejo sinaptonémico en cigotene, o a una desinapsis, i.e., falla en la formación de quiasmas luego de una sinapsis normal (Appels et al. 1998).

A partir del análisis del comportamiento de univalentes autosómicos realizado en *Acanonicus habni* (Coreidae) (Papeschi y Mola 1990a) y *Largus rufipennis* (Largidae) (Mola y Papeschi 1993), se ha sugerido que el comportamiento que poseen los univalentes en dichas especies -división ecuacional en anafase I y apareamiento denominado "touch-and-go" en metafase II- es una condición característica del estado de univalencia en una meiosis quiasmática normal, independientemente de si los univalentes son autosómicos o cromosomas sexuales, porque se asemeja al comportamiento de los cromosomas sexuales en los sistemas de determinación del sexo XY,  $X_nY$  y/o  $XY_n$ , presentes frecuentemente en Heteroptera (Ueshima 1979). Una excepción a este comportamiento es la segregación reduccional de los univalentes autosómicos en la primera división meiótica presente en *Calocoris quadripunctatus* (Heteroptera, Miridae), especie que posee una meiosis aquíasmática donde segregan reduccionalmente (Nokkala 1986).

De las especies estudiadas citogenéticamente en el presente trabajo de Tesis, únicamente en *Largus rufipennis* (Largidae), *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae), *Dysdercus albofasciatus*, *D. chaquensis* (Pyrrhocoridae), *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* (Rhopalidae) se observó un par de univalentes, estando involucrado en su formación el par autosómico mayor en la mayoría de los casos (PUBLICACIONES I, II, IV, V).

El estudio del comportamiento y las posibles causas implicadas en el origen de la univalencia sólo fue posible en la meiosis de *Dysdercus albofasciatus*, *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta*, debido a la elevada frecuencia de células con univalentes presente en sus individuos.

En el análisis citogenético de una muestra de *Largus rufipennis* procedente de Santo Tomé (provincia de Corrientes), los especímenes habían sido agrupados en tres categorías diferentes basándose en la frecuencia de células con univalentes: baja (3%), mediana (3-10%) y alta (10%) (Mola y Papeschi 1993). Además, se sugirió que los univalentes se habrían originado como resultado de una falla en la formación de quiasmas (desinapsis). Al comparar la frecuencia de univalentes presente en los individuos de la muestra de Santo Tomé con las observaciones realizadas en los ejemplares del presente estudio, se pone de manifiesto que todos los ejemplares

procedentes del arroyo Itaembé (provincia de Misiones) y la mayoría de los especímenes de Tornquist (provincia de Buenos Aires) pertenecen a la primera de estas categorías, mientras que en un solo individuo de esta última población se observó una frecuencia media. En la población de Costanera Norte, por otra parte, un individuo mostró una frecuencia media y los restantes una frecuencia alta de univalentes (PUBLICACION I).

En *Dysdercus albofasciatus* el bivalente sexual y, menos frecuentemente, un bivalente autosómico se observaron como univalentes. A pesar de la dificultad de analizar a los bivalentes durante paquitene, se pudo observar en diacinesis temprana que los cromosomas sexuales estaban conectados por una fina hebra de cromatina en algunas células. Por tal motivo, el origen de los univalentes podría deberse a desinapsis (PUBLICACION II).

Al analizar el comportamiento de los univalentes en *Jadera haematoloma* y en *J. sanguinolenta*, las observaciones descriptas concuerdan con los antecedentes. Los individuos analizados de ambas especies se caracterizaron por la presencia de un par de univalentes con una frecuencia variada, siendo el par autosómico mayor el más propenso a estar involucrado en su formación. Cabe destacar que todos los individuos de cada una de las poblaciones analizadas de ambas especies se capturaron desde fines de la primavera hasta fines del verano durante un período de seis años. Por consiguiente, si el aumento en la frecuencia de univalentes estuviera asociado con una condición ambiental particular anual o estacional, los univalentes no habrían aparecido en todas las poblaciones de ambas especies procedentes de localidades distantes. De este modo, un factor ambiental externo podría ser descartado como posible factor responsable de la univalencia. Sobre la base de que el par cromosómico mayor, casi siempre involucrado, pudo ser observado como un bivalente con uno o dos quiasmas terminales, o como univalentes en los especímenes analizados de ambas especies de *Jadera*, se ha sugerido que una de las regiones teloméricas de dicho par autosómico (A) se modificó, de manera tal que i) redujo la eficiencia en el apareamiento (asinapsis parcial) o ii) retrasó el apareamiento, restringiendo la presencia de entrecruzamientos. Como consecuencia, la frecuencia de quiasmas de este bivalente estaría disminuída. Si un quiasma terminal puede localizarse al azar en uno de los extremos teloméricos (A) o (B) del bivalente, la alteración de la región telomérica (A) daría como resultado la presencia de un par de univalentes en algunas células. Asimismo, la frecuencia esperada de bivalentes en anillo sería también muy baja debido a que en algunas células un solo entrecruzamiento tendría lugar en la región telomérica (B) (PUBLICACION IV).

Por otra parte, la posición terminal del quiasma en el bivalente autosómico mayor puede dar como resultado la formación de un amplio grupo de genes co-adaptados, debido al bajo nivel de recombinación; a su vez, la presencia de este par autosómico como un par de univalentes

produce consecuencias genéticas equivalentes. Además, el comportamiento altamente regular de los univalentes en *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* podría asegurar una elevada fertilidad de los individuos. Las características anteriormente mencionadas sugieren que la ausencia de quiasmas en este par autosómico podría ser considerado como una condición selectivamente neutra o, al menos, no perjudicial (PUBLICACION IV).

### Estudios Moleculares y Citogenético-Moleculares

Los estudios moleculares y citogenético-moleculares en Heteroptera representan un campo muy poco conocido para la ciencia mundial y más aun, en lo que respecta a la entomofauna Neotropical y a la de la Argentina. Por tal motivo, se iniciaron los estudios moleculares con el fin de evaluar los diferentes procedimientos de fijación y/o conservación, extracción de ADN genómico total y de determinar la localización cromosómica de los fragmentos de restricción aislados mediante hibridación *in situ*.

La pureza del ADN genómico total obtenido depende de varios factores, entre los cuales se deben tener en cuenta los reactivos y métodos utilizados durante la extracción y las características intrínsecas del material biológico a partir de la cual se extrae. Esto se debe a la posibilidad de extraer distintas sustancias conjuntamente con el ADN durante su aislamiento y que pudiesen interferir en las subsiguientes aplicaciones moleculares, considerándose en muchos casos como sustancias contaminantes (Reineke et al. 1998). Con el objeto de mejorar la pureza del ADN obtenido, numerosos métodos adicionales han sido propuestos para purificarlo de sustancias que hayan sido extraídas conjuntamente. Entre estas metodologías cabe mencionarse la cromatografía en columnas de hidroxapatita, columnas con filtro de fibra de vidrio, ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio y precipitación con espermina, entre otras (Vogelstein y Gillespie 1979, Hoopes y Mc Clure 1981, Reineke et al. 1998).

El problema de extraer y purificar simultáneamente otras sustancias contaminantes junto con el ADN genómico total es muy frecuente en trabajos con plantas. Entre estas sustancias, los polisacáridos, polifenoles y taninos constituyen el mayor problema debido a la dificultad de separarlos del ADN durante su extracción. Asimismo, muchos de los problemas encontrados en la clonación de ADN en plantas han sido atribuidos a estos contaminantes, los cuales interfieren posteriormente con la digestión mediante endonucleasas de restricción (Murray y Thompson 1980). Además, otros antecedentes moleculares llevados a cabo en plantas y bacterias revelan que una digestión parcial con endonucleasas de restricción puede ser el resultado de contaminación

del ADN con diversos inhibidores, tales como polisacáridos cargados negativamente y fenoles (Lin y Kuo 1995).

En levaduras, a partir del estudio molecular realizado por Meškauskas y colaboradores (1985) en ejemplares mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, se demostró que el ADN extraído estaba protegido contra la digestión con endonucleasas de restricción (EcoR I, Hind III, BamH I y Bgl II) por un pigmento rojo, producido por los propios mutantes del locus *ade-2* de esta especie. Este pigmento representa un tipo de polímero del compuesto intermediario (5-fosforibosil) aminoimidazol en la ruta biosintética de la adenina (Meškauskas et al. 1985).

De lo expuesto precedentemente, no sería sorprendente que un problema de sustancias contaminantes extraídas conjuntamente con el ADN ocurriese también en otros sistemas biológicos.

En virtud de la pureza del ADN genómico total extraído con cada una de las técnicas de fijación empleadas en el presente estudio molecular, se concluye que la mezcla fijadora alcohol metílico-alcohol etílico (1:1) no sería la más adecuada para conservar los ejemplares, por el contrario la conservación de los especímenes en nitrógeno líquido hasta su ulterior procesamiento sería el procedimiento más apropiado para estos fines.

Con respecto a los diferentes protocolos de extracción utilizados para extraer ADN genómico total de las diferentes especies en estudio, éstos pueden ser agrupados en dos categorías de acuerdo a los reactivos orgánicos empleados durante la extracción:

- (1) tratamiento con fenol equilibrado (Protocolos N°1-3),
- (2) tratamiento con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (Protocolo N°4).

Al comparar los resultados obtenidos con cada uno de ellos, se desprende que el protocolo N°4 resultó ser el más satisfactorio para efectuar las extracciones de ADN genómico total a partir de ejemplares completos, debido a la obtención de ADN sin signos de degradación. Aunque algunos residuos de ARN se observaron en las muestras extraídas de ADN, éstos fueron eliminados mediante el tratamiento con ARNasa. De este modo, se descartó su posible interferencia en la digestión con las endonucleasas de restricción. De los datos resultantes de la purificación adicional mediante la precipitación con espermina de las diferentes muestras de ADN, se pone de manifiesto que ésta no contribuyó de manera significativa a remover posibles sustancias extraídas junto con el ADN.

Teniendo en cuenta el problema que constituye extraer otras sustancias presentes en el material biológico conjuntamente con el ADN, es importante señalar que ciertos pigmentos localizados en el tegumento de los insectos, denominados pterinas, han sido considerados como

sustancias contaminantes, dado que resulta muy difícil su separación del ADN durante la extracción (numerosas comunicaciones personales).

Con respecto a la gama de los colores que exhiben los insectos, en su mayoría son el resultado de varios pigmentos acumulados en la cutícula, la epidermis, la hemolinfa y la grasa del cuerpo. Los colores de los adultos y de los estados inmaduros pueden agruparse en tres clases: pigmentarios o químicos, estructurales o físicos y combinación o colores fisicoquímicos (Richards y Davies 1983b). Los colores pigmentarios son debidos a sustancias químicas que absorben algunas longitudes de onda de la luz incidente y reflejan otras. Pueden estar presentes en la cutícula, epidermis o tejidos subepidérmicos, generalmente cuerpo graso o hemolinfa. Las sustancias implicadas en la pigmentación pueden clasificarse del siguiente modo: melaninas, carotenoides, pteridinas, omocromos, antraquinonas, afinas y pigmentos varios (Richards y Davies 1983b). Las melaninas son pigmentos cuticulares amorfos, altamente estables, pardos oscuros, rojos, o negros, generalmente no granulares e insolubles en los disolventes comunes, aunque son rápidamente decolorados por agentes oxidantes. Estos pigmentos son los más comunes y responsables del oscurecimiento de la cutícula luego de la muda (Richards y Davies 1983b). Los carotenoides son pigmentos polienos, fácilmente solubles en disolventes lipídicos, sintetizados de modo característico por las plantas (Lederer 1938). Cuando son ingeridos por animales se acumulan en la hemolinfa y tejidos sin experimentar ningún cambio o, a lo sumo, sufren alteraciones oxidativas secundarias y en algunos casos forman el grupo prostético de una cromoproteína (Richards y Davies 1983b). Las pteridinas son pigmentos derivados de estructuras del anillo pirimidina-pirazina heterocíclicos y se encuentran más frecuentemente en insectos que en otros organismos (Ziegler y Harmsen 1969, Richards y Davies 1983b). La mayor parte pertenece a la clase de las pterinas (2-amino-4-hidroxipteridinas) y el pigmento natural es con frecuencia una mezcla de dos o más de ellas. Así, los colores conspicuos de los géneros de Heteroptera *Dysdercus*, *Pyrrhocoris* (Pyrrhocoridae), *Oncopeltus* (Lygaeidae) y *Phonoctonus* (Reduviidae) son debidos a las pterinas roja y amarilla junto con la blanca, denominadas eritropterina, xantopterina y leucopterina, respectivamente. Además de su papel como pigmentos, algunas pterinas hidrogenadas pueden actuar metabólicamente como cofactores en reacciones de hidroxilación (Richards y Davies 1983b). Los otros tipos de pigmentos que aparecen en menor proporción son los omocromos o pigmentos oculares, las antraquinonas que están limitadas a los Coccoidea, las afinas que son quinonas policíclicas que se descomponen inmediatamente después de la muerte del insecto que las contiene y los pigmentos varios que son muchas otras sustancias que juegan un papel secundario como pigmentos de insectos, encontrándose en pequeñas cantidades o bien sólo en unas pocas especies (Richards y Davies 1983b). Los colores



estructurales difieren de los debidos a pigmentos en que experimentan cambios o son destruidos por cambios físicos en la cutícula, tales como los que resultan de encogimiento, hinchazón, distorsión o permeación con líquidos del mismo índice de refracción que la cutícula. Pueden distinguirse cuatro tipos de coloración estructural: blanco estructural, azul Tyndall, colores de interferencia y colores de difracción. Por último, los colores de combinación son producidos por modificaciones estructurales en conjunción con una capa de pigmento y son mucho más comunes que los colores puramente estructurales (Richards y Davies 1983b).

Sobre la base de los datos moleculares obtenidos en el presente estudio, si bien tanto las endonucleasas utilizadas de corte frecuente como las de corte infrecuente reconocieron sitios específicos de corte, no se observó la aparición diferencial de bandas específicas en ninguna de las especies estudiadas. Por un lado, estos resultados moleculares sugerirían que esta falta de bandeo de restricción en todas las especies podría deberse a la ausencia de ADN altamente repetitivo en su genoma. Sin embargo, no debería descartarse la posibilidad de que las pterinas sean extraídas junto con el ADN y, por ende, que pudieran actuar como sustancias contaminantes, interfiriendo o inhibiendo la digestión completa mediante las endonucleasas de restricción utilizadas. De esta manera, la posible presencia de las pterinas en las muestras de ADN genómico total traería aparejado una disminución de la pureza del ADN, constituyendo otro claro ejemplo de contaminantes.

Dentro del estudio molecular y citogenético-molecular llevado a cabo, es importante destacar la aparición de manera regular y constante de cuatro bandas durante las corridas electroforéticas correspondientes a muestras de ADN genómico total de *Jadera sanguinolenta* (Rhopalidae), sin haber sido utilizada ninguna endonucleasa de restricción. En términos generales, se puede plantear que los responsables que dieron lugar a la aparición de estas bandas podrían haber sido la presencia de bacterias simbioses en el tubo digestivo en los ejemplares de *Jadera sanguinolenta*, las cuales mediante sus enzimas de restricción escinden las moléculas de ADN extrañas en secuencias de reconocimiento específicas (Brecher y Wigglesworth 1944, Carayon 1951, Steinhaus et al. 1956, Büchner 1965, Richards y Davies 1983b, Schuh y Slater 1995); o la existencia de una predisposición genética a la ruptura cromosómica en sitios frágiles de sus cromosomas (Appels et al. 1998).

## CONCLUSIONES GENERALES

A continuación se expondrán las conclusiones más relevantes de cada una de las partes de esta Tesis.

Como es característico de Heteroptera, todas las especies analizadas citogenéticamente en el presente trabajo de Tesis poseen cromosomas holocinéticos y una meiosis de tipo pre-reduccional para los autosomas y post-reduccional para los cromosomas sexuales.

En Heteroptera el número de cromosomas es muy estable y la mayoría de sus familias se caracterizan por poseer un mismo número cromosómico diploide modal.

Los antecedentes citogenéticos disponibles para la familia Coreidae, al igual que los resultados obtenidos en los ejemplares analizados de *Athaumastus haematicus*, *Leptoglossus impictus* y *Phthia picta* en el presente estudio, muestran que el número modal característico de esta familia es  $2n = 21/22$  y sus sistemas cromosómicos de determinación del sexo más frecuentes son  $X0/XX$  y  $X_1X_20/X_1X_1X_2X_2$ .

Hasta el presente, el análisis citogenético realizado en 26 especies de la subfamilia Lygaeinae (Lygaeidae) revela que esta subfamilia posee un número cromosómico diploide entre 12 y 22, y un sistema cromosómico de determinación del sexo  $XY/XX$ , excepto en *Arocatus suboenens* ( $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ ).

Desde el punto de vista citogenético, Pyrrhocoridae es una familia heterogénea y la diversidad que presenta es debido a diferencias tanto en el complemento cromosómico diploide ( $2n$  entre 13/14 y 33/34) como en los sistemas cromosómicos de determinación del sexo ( $X0$ ,  $X_1X_20$ ,  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  y neo- $XY$ ).

El número modal de la familia Rhopalidae es  $2n = 13$  y la subfamilia Serinethinae se caracteriza por poseer un complemento cromosómico diploide  $2n = 13$ , un par de cromosomas  $m$  y un sistema de determinación sexual  $X0/XX$ .

La evolución del cariotipo en Heteroptera está íntimamente ligada a la naturaleza holocinética de sus cromosomas, la meiosis post-reduccional, el comportamiento asináptico de los cromosomas sexuales y un sistema estable de determinación sexual.

En Heteroptera las fusiones y las fragmentaciones cromosómicas son las alteraciones estructurales más frecuentemente halladas y, por ende, podrían ser consideradas como los reordenamientos cromosómicos que han desempeñado un papel relevante en la evolución cariotípica.

Los resultados citogenéticos del presente trabajo de Tesis revelan la existencia de unos pocos casos de diversidad cromosómica numérica intraespecífica debida tanto a diferencias en el número de autosomas como de cromosomas sexuales y, a veces, a la presencia de cromosomas supernumerarios o B.

Teniendo en cuenta que el número modal de la familia Coreidae es  $2n = 21 (18+2m+X0)$ , se propone que una fusión autosómica habría dado origen al complemento cromosómico diploide ( $2n = 19 = 16+2m+X0$ ) de *Hypsilonotus bitriangulifer bitriangulifer*

Considerando que el número cromosómico diploide atávico del género *Lygaeus* (Lygaeinae, Lygaeidae) es  $2n = 14 (12+XY)$ , se postula que el complemento cromosómico de *Lygaeus alboornatus* ( $2n = 12 = 10+XY$ ) se habría originado a través de una fusión autosómica. Asimismo, cabe destacar que *L. alboornatus* posee el  $2n$  más bajo de la subfamilia Lygaeinae citado hasta el presente.

Se sugiere que el par autosómico marcadamente mayor observado en *Lygaeus alboornatus* (Lygaeinae) sería homólogo al de las especies de Henestarinae, Chauliopininae, Orsillinae y Blissinae y se habría originado a través de una fusión autosómica.

Del total de especies del género *Dysdercus* analizadas citogenéticamente hasta el presente, se desprende que las especies del Nuevo Mundo muestran diferencias con respecto al complemento cromosómico diploide ( $2n = 12$  a  $16$ ) y a los sistemas cromosómicos de determinación del sexo ( $X0$ ,  $X_1X_20$  y neo- $XY$ ); opuestamente, todas las especies del Viejo Mundo presentan homogeneidad cariotípica ( $2n = 16/18 = 14+X_1X_20/14+X_1X_1X_2X_2$ ).

En relación con las variaciones numéricas debidas a la presencia de cromosomas supernumerarios o B, estos cromosomas se observaron en un solo individuo de *Largus fasciatus* (Largidae) en un bajo porcentaje de células y en cuatro especímenes de una población de *Dysdercus albofasciatus* (Pyrrhocoridae) en un porcentaje variado de células. Basándose en las observaciones realizadas en *Dysdercus albofasciatus* se sugiere que el cromosoma B se habría originado a partir de un autosoma por fragmentación.

Hasta el presente, no se conocen ejemplos de polimorfismos cromosómicos ni de heterocigosis para deficiencias o duplicaciones en poblaciones naturales de Heteroptera.

Si bien las translocaciones son sucesos que ocurren muy raramente en Heteroptera, tendrían potencialmente grandes posibilidades de establecerse en especies con cromosomas holocinéticos debido a que sus productos son transmisibles en la meiosis.

En el presente trabajo de Tesis se describe una translocación recíproca desigual entre dos cromosomas no homólogos de tamaño mediano en un individuo de *Largus rufipennis* (Largidae).

Si bien en los cromosomas holocinéticos de Heteroptera la actividad cinética está restringida a una de las regiones teloméricas, el cuadrivalente presente en el individuo de *Largus rufipennis* tendría otros sitios alternativos de unión a las fibras del huso además de las teloméricas.

Los resultados del análisis citogenético en el individuo portador de la translocación sugieren una gran disminución en su fertilidad, lo que hace poco probable que este reordenamiento cromosómico conforme un polimorfismo balanceado o se establezca en la población.

La mayoría de las especies de Heteroptera presentan el sistema cromosómico de determinación del sexo XY/XX y con menor frecuencia el sistema X0/XX, mientras que los sistemas múltiples originados por fragmentación del cromosoma X o del cromosoma Y están presentes en pocas especies. Además, la presencia de neo sistemas sólo ha sido mencionado en *Rhytidolomia semilis* (Pentatomidae), *Lethocerus indicus* y *Lethocerus* sp (Belostomatidae)

Cabe destacar que el análisis citogenético realizado en *Dysdercus albofasciatus* reveló la presencia de un sistema sexual neo-XY, el cual es original para el género, al igual que para la familia Pyrrhocoridae y para Heteroptera. Con respecto al tipo de meiosis, el bivalente sexual en *Dysdercus albofasciatus* presenta una meiosis de tipo pre-reduccional, presentando un comportamiento meiótico similar al descripto para los autosomas.

En especímenes analizados de *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* (Rhopalidae) se detectó la presencia de un polimorfismo cromosómico sexual en relación con el tamaño del cromosoma X, el cual se debería probablemente a la adición de heterocromatina durante la evolución.

En Heteroptera durante la profase meiótica temprana, después de paquitene, la célula entra en un estadio difuso cuyas características y duración dependen de las especies. En el análisis de la

meiosis de *Dysdercus chaquensis* (Pyrrhocoridae) se observó la ausencia de este estadio en todos los especímenes estudiados de la población endocriada, mientras que los ejemplares de la población natural se caracterizaron por la presencia de este estadio.

Estos resultados representan la primera evidencia citogenética de la ausencia de un estadio meiótico, como el estadio difuso, en una población endocriada mantenida bajo condiciones uniformes.

En el análisis citogenético de *Dysdercus imitator* (Pyrrhocoridae) se observó la persistencia de los nucléolos y de varios cuerpos prenucleolares a lo largo de todos los estadios meióticos, que podría estar relacionada con una intensa actividad transcripcional a fin de producir ARN ribosomal requerido para la espermiogénesis.

Todas las especies de Coreidae y Rhopalidae analizadas en el presente trabajo de Tesis se caracterizan por poseer un par de cromosomas *m*, cuyo comportamiento es esencialmente similar y presentan una meiosis de tipo pre-reduccional.

Si bien se ha aceptado como regla general que la mayoría de las especies de Heteroptera poseen un quiasma por bivalente, el análisis citogenético realizado a partir de ejemplares de *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae), *Dysdercus imitator* (Pyrrhocoridae), *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* (Rhopalidae) contribuye a mostrar que la frecuencia de bivalentes con dos quiasmas sería mucho más alta que la originalmente sugerida.

De las especies estudiadas citogenéticamente en el presente trabajo, sólo en *Largus rufipennis* (Largidae), *Lygaeus alboornatus* (Lygaeidae), *Dysdercus albofasciatus*, *Dysdercus chaquensis* (Pyrrhocoridae), *Jadera haematoloma* y *J. sanguinolenta* (Rhopalidae) se observó la presencia de un par de univalentes; en la mayoría de los casos el par autosómico mayor estuvo involucrado en dicha univalencia.

En el presente trabajo los estudios moleculares y citogenético-moleculares involucraron la comparación y evaluación de diferentes procedimientos de fijación y/o conservación, de distintos métodos de extracción de ADN genómico total y la localización de fragmentos aislados de ADN sobre cromosomas meióticos mediante técnicas de hibridación *in situ*.

Al comparar la pureza del ADN genómico total extraído, se puede concluir que el mantenimiento de los especímenes a -70°C en nitrógeno líquido constituye la técnica de fijación y/o conservación más apropiada para la extracción de ADN.

De los resultados moleculares obtenidos en las especies estudiadas, se desprende que la extracción de ADN genómico total mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico resultó ser la metodología más adecuada para tales fines, dado que las muestras de ADN no presentaban signos de degradación.

Los datos moleculares resultantes de la digestión del ADN con endonucleasas de restricción revelan la falta de bandeo de restricción en todas las especies estudiadas, que podría deberse a la ausencia de ADN altamente repetitivo en su genoma. Sin embargo, no debería descartarse la posibilidad de que ciertas sustancias contaminantes, tales como las pterinas, sean extraídas junto con el ADN y pudieran actuar interfiriendo o inhibiendo la digestión completa mediante enzimas de restricción.

La aparición de cuatro bandas de distinto peso molecular en el ADN de *Jadera sanguinolenta* podría deberse a la presencia de bacterias simbiotes en sus ciegos gástricos, las cuales, mediante sus enzimas de restricción producirían la escisión de las moléculas de ADN de esta especie en secuencias de reconocimiento específicas. No obstante, la existencia de una posible predisposición genética a rupturas en sitios frágiles en los cromosomas de *J. sanguinolenta* no podría ser descartada como otra posible hipótesis para explicar la aparición de estas cuatro bandas.

La caracterización citogenética y citogenética-molecular de las distintas poblaciones de especies fitófagas pertenecientes a las familias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae y Rhopalidae contribuyó a ampliar los conocimientos existentes sobre ellas y ha permitido inferir hipótesis acerca de algunos mecanismos adaptativos y evolutivos involucrados en el origen de las variaciones intra e interpoblacionales en las especies.

## ABREVIATURAS

A	autosomas
ADN	ácido desoxiribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
BSA	suero fetal bovino
°C	grados Celsius
cm	centímetro
DAPI	4'6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	etilendiamino-tetracetato disódico
HCL	ácido clorhídrico
hs	horas
Kb	kilobases
KCN	cianuro de potasio
luz U.V.	luz ultravioleta
µg	microgramo
µl	microlitro
ml	mililitro
min	minuto/minutos
nm	nanómetro
No <sub>3</sub> Ag	nitrato de plata
pb	pares de bases
%	porcentaje
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil-sulfato de sodio
Tris-HCl	tris-ácido clorhídrico
W/D	watts/diámetro



## SOLUCIONES

Solución	Método de preparación	Volumen Final ml)
Acetato de sodio 3M (pH 5,2)	408,3 mg de acetato de sodio-3H <sub>2</sub> O en 800 ml de aguas bidestilada, ajustar el pH con ácido acético y llevar a volumen final.	1.000
Acetato de sodio 0,3M (pH 5,2)	40,83 mg de acetato de sodio-3H <sub>2</sub> O en 800 ml de aguas bidestilada, ajustar el pH con ácido acético y llevar a volumen final.	1.000
Acetato de sodio 0,01M (pH 5,2)	13,61 mg de acetato de sodio-3H <sub>2</sub> O en 800 ml de aguas bidestilada, ajustar el pH con ácido acético glacial y llevar a volumen final.	1.000
Ácido acético 45%	450 ml de ácido acético glacial y 550 de agua.	1.000
Alcohol etílico 70%	700 ml de alcohol etílico y 300 ml de agua.	1.000
Alcohol metílico:ácido acético glacial (3:1)	750 ml de alcohol metílico y 250 ml de ácido acético glacial.	1.000
Alcohol metílico:alcohol etílico (1:1)	500 ml de alcohol metílico y 500 ml de alcohol etílico.	1.000
ARNasa (10 mg/ml)	10 mg de ARNasa en 0,9 ml de acetato de sodio 0,01M (pH 5,2), calentar a 100°C durante 15 min, dejar templar hasta temperatura ambiente y agregar 0,1 ml de Tris-HCl 1M (pH 7,4).	1
BSA 5% (p/v)	en 4XSSC/tween 0,2%. Mezclar bien utilizando vortex.	
Bromuro de etidio (10 mg/ml)	1 g de bromuro de etidio en 100 ml de agua y agitar en un agitador magnético durante varias horas.	100
Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)	960 ml de cloroformo y 40 ml de alcohol isoamílico.	1.000
Cloruro de magnesio (Cl <sub>2</sub> Mg) 10mM	2,033 g de cloruro de magnesio-6H <sub>2</sub> O en 800 ml de agua bidestilada. Llevar a volumen final.	1.000
Cloruro de sodio (ClNa) 5M	292,2 g de cloruro de sodio en 800 ml de agua bidestilada y llevar a volumen final.	1.000
Dodecil-sulfato de sodio (SDS) 10% (pH 7,2)	100 g de dodecil-sulfato de sodio en 900 ml de agua bidestilada, calentar a 68°C hasta su disolución, ajustar el pH con HCl concentrado y llevar a volumen final.	1.000
Dodecil-sulfato de sodio (SDS) 5%	50 g de dodecil-sulfato de sodio en 900 ml de agua bidestilada, calentar a 68°C hasta su disolución y llevar a volumen final.	1.000
Dodecil-sulfato de sodio (SDS) 10%	100 g de dodecil-sulfato de sodio en 900 ml de agua bidestilada, calentar a 68°C hasta su disolución y llevar a volumen final.	1.000
Dodecil-sulfato de sodio (SDS) 20%	200 g de dodecil-sulfato de sodio en 900 ml de agua bidestilada, calentar a 68°C hasta su disolución y llevar a volumen final.	1.000
Etilen-diamino-tetraacetato de disodio (EDTA) 300mM (pH 8,0)	186,1 g de etilen-diamino-tetraacetato de disodio en 800 ml de agua bidestilada, agitar vigorosamente en un agitador magnético, ajustar el pH con NaOH y llevar a volumen final.	1.000

Etilen-diamino-tetraacetato de disodio (EDTA) 0,5M (pH 8,0)	186,1 g de etilen-diamino-tetraacetato de disodio en 800 ml de agua bidestilada, agitar vigorosamente en un agitador magnético, ajustar el pH con NaOH y llevar a volumen final.	1.000
Fenol equilibrado (pH 7,5)	50 ml de Tris base, 350 ml de fenol fundido a baño maría y 600 ml de agua bidestilada.	1.000
Feulgen	1 g de fuxina básica, 1,9 g de metabisulfito de sodio y 100 ml de HCl 0.15N.	100
Hematoxilina acética	1 g de hematoxilina en 50 ml de solución acuosa al 45% de ácido acético y dejar madurar destapado durante 15-30 días.	50
Nitrato de plata (NO <sub>3</sub> Ag)	1 g de NO <sub>3</sub> Ag disuelto en 1 ml de agua deionizada, previamente ajustada a pH 3-3,5 con ácido fórmico.	1
Paraformaldehído 4% (p/v)	Calentar la solución (100 ml) hasta que llegue a 60°C y adquiera un aspecto lechoso, adicionar 2 ml de NaOH 1M. Dejar enfriar a temperatura ambiente.	100
Perclorato de sodio 2,9M	354,96 g de perclorato de sodio en 800 ml de alcohol etílico 80%, agitar y llevar a volumen final.	1000 ml
Proteínasa K (20 mg/ml)	20 mg de proteínasa K en 1 ml de agua bidestilada estéril.	1
Solución A de la solución de extracción	1,57315 g de Tris base 0,05M, 1,461 g de ClNa 0,1M y 9,302 g de EDTANa <sub>2</sub> 0,1M en 180 ml de agua bidestilada, ajustar con OHNa 10N a pH 7 y llevar a volumen final.	250
Solución con anti-dig FITC	1/40 anti-dig en BSA al 5%	
Solución tampón de carga (Loading buffer) (tipo III) 6X	0,025 g de azul de bromofenol, 0,025 g de xilene cianole FF y 3 ml de glicerol. Llevar a volumen final.	10
Solución tampón de extracción	800 ml de la solución A, 25 ml de SDS 20%, 10 ml de proteínasa K (20 mg/μl) y llevar a volumen final.	1.000
Solución tampón de intercambio de cationes	125 ml de acetato de sodio 0,3M, 125 ml de cloruro de magnesio 10mM y 750 ml de alcohol etílico absoluto.	1.000
Solución tampón tris acetato (TAE) 50X	242 g de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5M (pH 8)	
Solución tampón tris borato (TBE) 5X	54 g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0,5M (pH 8)	
Solución tampón TE 10X (pH 8)	100 ml de Tris-HCl 1M (pH 8), 20 ml de etilen-diamino-tetraacetato de disodio 0,5M (pH 8.0) y adicionar 880 ml de agua bidestilada.	1.000
Tetrahidrocloruro de espermina 50mM	17,411 g en 1.000 ml de agua bidestilada estéril.	1.000
Tris 1M (pH 7,4)	1,211 g de Tris base en 8 ml de agua bidestilada, ajustar el pH con 0,7 ml de HCl concentrado y llevar a volumen final.	10
Tris 1M (pH 8)	121,1 g de Tris base en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el pH con 42 ml de HCl concentrado y llevar a volumen final.	1.000

## AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), y ha sido desarrollada en el marco de las actividades científicas y docentes que desempeño en la Cátedra de Citología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP).

Las siguientes Instituciones Nacionales y Provinciales han contribuido a la realización de esta Tesis: Universidad Nacional de La Plata, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Universidad de Buenos Aires, Administración de Parques Nacionales (Dirección Nacional de Conservación de Áreas Protegidas, Secretaría de Turismo, Presidencia de la Nación) y Dirección de Áreas Protegidas del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Provincia de Buenos Aires.

Los Profesores Dr. Marcelo Luis Larramendy y Dra. Alba Graciela Papeschi han sido los Directores de esta Tesis Doctoral, quienes me han cobijado con su rigurosa enseñanza e invaluable relación personal. Su distinguida dirección no podrá ser compensada en buena medida. A ellos les debo un agradecimiento para siempre.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Axel Bachmann (Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Buenos Aires), a la Licenciada María Marta Schang (Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Buenos Aires), al Dr. Harry Brailovsky (Universidad Autónoma de México) y al Dr. Pieter H. van Doesburg (National Natural History Museum, Leiden) por sus colaboraciones desinteresadas en la determinación taxonómica del material en estudio, y por sus aportes y enseñanzas durante el desarrollo de la presente Tesis.

Asimismo, les agradezco a la Dra. Lidia Poggio, a la Dra. Liliana María Mola y al Dr. Eduardo Greizerstein por las críticas y sugerencias brindadas, así como por las facilidades y el apoyo prestado durante la realización del presente estudio.

A Pablo Javier Rebagliatti y a Sergio Rodríguez Gil con quienes compartí innumerables viajes de colección.

Al Dr. Teodoro Stadler y a Fabián Tricarico del Laboratorio de Parasitología del Museo Argentino de Historia Natural “Bernardino Rivadavia” de Buenos Aires, por proporcionar los especímenes criados en laboratorio de *Dysdercus chaquensis*.

Finalmente, vaya mi agradecimiento a los que colaboraron de una u otra manera en la realización y desarrollo de esta Tesis Doctoral: Martín Kohan, Santiago Ituarte, Victoria Frassa y Victoria Cattani.

## REFERENCIAS

- Albertson, D. G., & N. Thompson. 1982. The kinetochores of *Caenorhabditis elegans*. Chromosoma 86: 409-428.
- Amyot, C. J. B., & A. Serville. 1843. Histoire naturelle des insectes Hémiptères. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris.
- Appels, R., R. Morris, B. S. Gill, & C. E. May. 1998. Chromosome Biology. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Banerjee, M. K. 1959. Chromosome elimination during meiosis in the males of *Macroceroea (Lobita) grandis* (Gray). Proceedings of the Zoological Society of Calcutta 12: 1-8.
- Banerjee, M. R. 1958. A study of the chromosomes during meiosis in twenty-eight species of Hemiptera (Heteroptera, Homoptera). Proceedings of the Zoological Society of Calcutta 11: 9-37.
- Battaglia, E., & J. W. Boyes. 1955. Post-reductional meiosis: its mechanism and causes. Caryologia 8: 87-134.
- Bauer, H. 1952. Die chromosomen in soma der Metazoen. Zoologischer Anzeiger 17: 252.
- Bayreuther, K. 1955. Holokinetische chromosomen bei *Haematopinus suis* (Anoplura, Haematopinidae). Chromosoma 7: 260-270.
- Benavente, R. 1982. Holocentric chromosomes of arachnids: presence of kinetochore plates during meiotic divisions. Genetica 59: 23-27.
- Bidau, C. J., & D. A. Marti. 2001. Meiosis and the neo-XY system of *Dychroplus vittatus* (Melanoplinae, Acrididae): a comparison between sexes. Genetica 110: 185-194.
- Bogenberger, J. M., H. Neitzel, & F. Fittler. 1987. Highly repetitive DNA component common to all Cervidae: its organization and chromosomal distribution during evolution. Chromosoma 95: 154-161.
- Borror, D. J., C. A. Triplehorn, & N. F. Johnson. 1989. An introduction to the study of insects. Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Bosq, J. M. 1937. Lista preliminar de los Hemipteros (Heteropteros), especialmente relacionados con la agricultura nacional. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 9: 111-134.
- Bosq, J. M. 1940. Lista preliminar de los Hemipteros (Heteropteros), especialmente relacionados con la agricultura nacional (Continuación). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 10: 399-417.
- Brecher, G., & V. B. Wigglesworth. 1944. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. Parasitology 35: 220-224.
- Browne, E. N. 1910. The relation between chromosome numbers and species in *Notonecta*. Biological Bulletin 20: 19.
- Browne, E. N. 1913. A study of the male germ cells in *Notonecta*. Journal of Experimental Zoology 14: 61.
- Browne, E. N. 1916. A comparative study of the chromosomes of six species of *Notonecta*. Journal of Experimental Zoology 14: 61.
- Brutlag, D. L. 1980. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. Annual Review of Genetics 14: 121-144.
- Buck, R. C. 1967. Mitosis and meiosis in *rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. Journal of Ultrastructure Research 18: 489-501.
- Büchner, P. 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience Publishers, New York.
- Cabrera, A. L., & A. Willink. 1980. Biogeografía de América Latina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.

- Camacho, J. P. M., J. Belda, & J. Cabrero. 1985.** Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analysed by C-banding and silver impregnation. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 27: 490-497.
- Carayon, J. 1951.** Les mécanismes de transmission héréditaire des endosymbiontes chez les insectes. *Tijdschrift voor Entomologie* 49: 111-142.
- Cardoso, H., & A. Dutra. 1979.** The Neo-X, neo-Y sex pair in Acrididae, its structure and association. *Chromosoma* 70: 323-336.
- Carter, W. 1962.** Insects in relation to plant diseases. Wiley, New York.
- Colombo, P. C., & C. J. Bidau. 1985.** Estudios preliminares en heterópteros argentinos. I. Los cromosomas meióticos de cinco especies de Coreidae. *Physis*: 29-40.
- Comings, D. E. 1972.** Methylation of euchromatic and heterochromatic DNA. *Experimental Cell Research* 74: 383-390.
- Comings, D. E., & T. A. Okada. 1972.** Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma* 37: 177-192.
- Charlesworth, B. W., & J. D. Wall. 1999.** Inbreeding, heterozygote advantage and the evolution of neo-X and neo-Y sex chromosomes. *Proceedings of the Royal Society of London* 266: 51-56.
- Chickering, A. M. 1927a.** An usual complex in *Lethocerus*. *Anatomical Record* 37: 156.
- Chickering, A. M. 1927b.** Spermatogenesis in the Belostomatidae. II. The chromosomes and cytoplasmic inclusions in the male germ cells of *Belostoma flumineum* Say, *Lethocerus americanus* Leidy, and *Benacus griseus* Say. *Journal of Morphology and Physiology* 44: 541-607.
- Chickering, A. M., & B. Bacorn. 1933.** Spermatogenesis in the Belostomatidae. IV. Multiple chromosomes in *Lethocerus*. *Papers of Michigan Academy of Science* 17: 529-533.
- Chopra, N. P. 1967.** The higher classification of the family Rhopalidae (Hemiptera). *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 119: 363-399.
- Da Costa Lima, A. 1940.** Hemípteros, pp. 351. In E. N. d. Agronomia [ed.], *Insetos do Brasil*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.
- Darlington, C. D. 1937.** Recent advances in cytology. Churchill, London.
- Darlington, C. D. 1939.** The genetical and mechanical properties of sex chromosomes. V. *Cimex* and the Heteroptera. *Journal of Genetics* 39: 101-137.
- Davies, R. G. 1991.** Introducción a la Entomología. Mundi-Prensa, Madrid.
- De La Fuente, J. A. 1994.** Zoología de Artrópodos. Interamericana, Mac Graw Hill, Madrid.
- Dernburg, A. E. 2001.** Here, there, and everywhere: kinetochore function on holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 153: 33-38.
- Di Castro, M., G. Prantera, L. Cipriani, & A. Rocchi. 1983.** Silver staining analysis of nucleolar-organizer activity during spermatogenesis of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). *Genetica* 60: 163-166.
- Dopchiz, L. P., L. Poggio, & E. R. Guaglianone. 2000.** Estudios cromosómicos en especies de *Rhynchospora* y *Pleurostachys* (Cyperaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 35: 325-330.
- Dutt, M. K. 1957.** Cytology of three species of coreid bugs with special reference to multiple sex chromosome mechanism. *Genetica* 29: 110-119.
- Emelyanov, A. F., & V. I. Kirillova. 1989.** Trends and modes of karyotype evolution in the Cicadina (Homoptera). I. Peculiarities and evolutionary changes of the karyotypes in the superfamily Cicadelloidea. *Entomologicheskoe Obozrenie* 68: 587-603.
- Emelyanov, A. F., & V. I. Kirillova. 1991.** Trends and modes of karyotype evolution in the Cicadina (Homoptera). II. Peculiarities and evolutionary changes of the karyotypes in the superfamilies Cercopoidea, Cicadoidea, Fulgoroidea, and in the Cicadina as a whole (Homoptera). *Entomologicheskoe Obozrenie* 70: 796-817.
- Fabricius, J. C. 1803.** Systema Rhyngotorum. Aoud Carolum Reichard, Brunsvigiae.



- Fieber, F. X. 1861. Die europäischen Hemiptera. Halbflügler (Rhynchota Heteroptera). Carl Gerold's Sohn, Vienna.
- Foot, K., & E. C. Strobell. 1907a. A study of chromosomes in the spermatogenesis of *Anasa tristis*. Biological Bulletin 7: 279.
- Foot, K., & E. C. Strobell. 1907b. The accessory chromosome of *Anasa tristis*. Biological Bulletin 12: 119.
- Foot, K., & E. C. Strobell. 1912. A study of chromosomes, chromatin, and nucleoli in *Euchistus crassus*. Archives fuer Zellforschung 9: 47.
- Foot, K., & E. C. Strobell. 1914. The chromosomes of *Euchistus variolarius*. *Euchistus servus* and the hybrids of the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations. Archives fuer Zellforschung 12: 485.
- Fossey, A., & H. Liebenberg. 1995. Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Carlisia wahlbergi* Stål (Coreidae: Heteroptera). Cytobios 81: 7-15.
- Freifelder, D. 1983. Molecular biology: a comprehensive introduction to prokariotes and eukariotes. Ed. Revol., La Habana.
- Garagna, S., C. A. Redi, & E. Capanna. 1993. Genome distribution, chromosomal allocation, and organization of the major and minor satellite DNAs in 11 species and subspecies of the genus *Mus*. Cytogenetics and Cell Genetics 64: 247-255.
- García Tavares, M., & M. T. Vilela de Azeredo-Oliveira. 1997. Pattern of nucleolar activity during spermiogenesis in triatomines (Heteroptera, Reduviidae) as analysed by silver staining. Cytobios 89: 93-103.
- Goday, C., A. Ciofi-Luzzatto, & S. Pimpinelli. 1985. Centromere ultrastructure in germ-line chromosomes of *Parascaris*. Chromosoma 91: 121-125.
- Golub, N. V., & S. Nokkala. 2001. The karyotypes of two bark-lice species (Psocoptera, Psocomorpha, Amphipsocidae): the first description of the neo-XY sex chromosome system in Psocoptera. Folia biologica (Kraków) 49: 153-156.
- Göllner-Scheiding, U. 1983. General-Katalog der familie Rhopalidae (Heteroptera). Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin 59: 37-189.
- Gomez, J. 1938. Sobre o *Dysdercus longirostris* Stål. Um percevejo sugador de laranjas no D. Federal. O Campo 9: 58-60.
- González-García, J. M., C. Antonio, J. A. Suja, & J. S. Rufas. 1996. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). Chromosome Research 4: 124-132.
- Grant, V. 1989. Especiación Vegetal. Editorial Limusa, Mexico.
- Gross, J. 1904a. Die spermatogenese von *Syromastes marginatus*. Zoologische Jahrbuecher 20: 439.
- Gross, J. 1904b. Ein beitrage zur spermatogenese der hemipteran. Verhandlungen der Deutschen zoologischen Gesellschaft 9: 180.
- Gross, J. 1907. Die spermatogenese von *Pyrrhocoris apterus* L. Zoologische Jahrbuecher 23: 269.
- Gross, J. 1912. Heterochromosomen und geschlechtsbestimmung bei insekten. Zoologische Jahrbuecher 32: 99.
- Grozeva, S., & S. Nokkala. 1996. Chromosomes and their meiotic behavior in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). Hereditas 125: 31-36.
- Halkka, O. 1956. Studies on the mitotic and meiotic cell division in certain Hemiptera under normal and experimental conditions. Annales Academiae Scientiarum Fennicae 32: 5-80.
- Halkka, O. 1959. Chromosome studies on the Hemiptera Homoptera Auchenorrhyncha. Annales Academiae Scientiarum Fennicae 43: 1-71.
- Hamilton, M. J., R. L. Honeycutt, & R. J. Baker. 1990. Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice. *Reithrodontomys*: evidence from in situ hybridization. Chromosoma 99: 321-329.
- Heizer, P. 1950. The chromosome cytology of two species of the Pacific genus *Oechalia* (Pentatomidae, Hemiptera-Heteroptera), *Oechalia patruelis* Stål and *Oechalia pacifica* Stål. Journal of Morphology 87: 179-226.



- Helenius, O. 1952.** The mode of bivalent orientation in the Hemiptera. *Hereditas* 38: 420-434.
- Helle, W., & M. Wysoki. 1983.** The chromosomes and sex determination of some actinotrichid taxa Acari with special reference to Eryophyidae. *International Journal of Acarology* 9: 67-72.
- Henikoff, S., K. Ahmad, & H. S. Malik. 2001.** The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293: 1098-1102.
- Henking, H. 1891.** Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten. II. Über spermatogenese und deren Beziehung zur Eientwicklung bei *Pyrrhocoris apterus* L. *Zeitschrift fuer wiseen schaftliche Zoologie* 51: 685-736.
- Henry, T. J. 1988.** Family Largidae Amyot and Serville, 1843. The largid bugs, pp. 159-165. In T. J. Henry and R. C. Froeschner [eds.], *Catalog of the Heteroptera, or true bugs, of Canada and the continental United States*. Brill, E J, Leiden.
- Hewitt, G. M. 1979.** Orthoptera, Grasshoppers and Crickets, pp. 1-170. In B. J. G. Borntraeger [ed.], *Animal Cytogenetics 3, Insecta*, Berlin-Suttgart.
- Hoopes, B. C., & W. R. Mc Clure. 1981.** Studies on the selectivity of DNA precipitation by spermine. *Nucleic Acids Research* 9: 5493-5504.
- Howe, M., K. L. McDonald, D. G. Albertson, & B. J. Meyer. 2001.** HIM-10 is required for kinetochore structure and function on *Caenorhabditis elegans* holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 153: 1227-1238.
- Hoy, W. E. 1914.** A preliminary account of the chromosomes in the embryos of *Anasa tristis* and *Diabrotica vittata*. *Biological Bulletin* 27: 45-51.
- Hughes-Schrader, S. 1942.** The chromosomes of *Nautococcus schraderae* Vays and the meiotic division figures of male Llaveine coccids. *Journal of Morphology* 70: 261-299.
- Hughes-Schrader, S. 1948.** Cytology of coccids (Coccoidea-Hemiptera). *Advances in Genetics* 2: 127-203.
- Hughes-Schrader, S., & H. Ris. 1941.** The diffuse spindle attachment of coccids as verified by the mitotic behavior of induced fragments. *Journal of Experimental Zoology* 87: 429-456.
- Hughes-Schrader, S., & F. Schrader. 1956.** Polyteny as a factor in the chromosomal evolution of the Pentatomini (Hemiptera). *Chromosoma* 8: 135-151.
- Hughes-Schrader, S., & F. Schrader. 1957.** The *Nezara* complex (Pentatomidae Heteroptera) and its taxonomic and cytological status. *Journal of Morphology* 101: 1-24.
- Hughes-Schrader, S., & F. Schrader. 1961.** The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327-350.
- Jacobs, D. H., & H. Liebenberg. 2001.** Cytogenetics of *Adamanotus uncotibialis* Jacobs (Heteroptera: Aradidae). *Caryologia* 54: 83-96.
- Jande, S. S. 1959.** An analysis of the chromosomes in the four species of the family Belostomatidae (Heteroptera, Cryptocerata). *Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University* 10: 25-34.
- Jande, S. S. 1960.** Pre-reductional sex chromosomes in the family Tingidae (Gymnocerata-Heteroptera). *The Nucleus* 3: 209-214.
- Jande, S. S. 1961.** Chromosome studies in the family Notonectidae (Cryptocerata-Heteroptera). *Chromosoma* 12: 318-326.
- John, B. 1988.** The biology of heterochromatin, pp. 1-147. In R. S. Verma [ed.], *Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones, G. H. 1987.** Chiasmata, pp. 213-244. In P. B. Moens [ed.], *Meiosis*. Academic Press, London.
- Keyl, H. G. 1957.** Zur karyologie der Hydrachnellen (Acarina). *Chromosoma* 8: 719-729.
- Kiauta, B. 1975.** Cytotaxonomy of dragonflies with special reference to the Nepalese fauna. Third Khumbu Himal Research expedition of The Netherlands centre for alpine biological Research, Utrecht (July-November, 1974). Nepal Research Center, Kathmandu.

- King, M. 1993.** Species evolution. The role of chromosome change. Cambridge University Press, Cambridge.
- Klásterská, I. 1974.** The role of the diffuse stage in the cytological problems of meiosis in *Rosa*. Hereditas 76: 109-116.
- Klásterská, I. 1976.** A new look on the role of the diffuse stage in problems of plant and animal meiosis. Hereditas 82: 193-204.
- Klásterská, I. 1977.** The concept of the prophase of meiosis. Hereditas 86: 205-210.
- Klásterská, I. 1978.** Structure of eukaryotic chromosomes: the differences between mammalian (mouse), grasshopper (*Stethophyma*) and plant (*Rosa*) chromosomes as revealed at the diffuse stage of meiosis. Hereditas 88: 243-253.
- Knuutila, S., S. J. Nylund, M. Wessman, & M. Larramendy. 1994.** Analysis of genotype and phenotype on the same interphase or mitotic cell: a manual of MAC (Morphology Antibody Chromosomes) methodology. Cancer Genetics and Cytogenetics 72: 1-15.
- Kukulová-Peck, J. 1991.** Fossil history and the evolution of Hexapod structures, pp. 141-179, The Insects of Australia. Melbourne University Press.
- Kuznetsova, V. G. 1988.** The unusual mechanism of sex-chromosome determination in the cotton bug *Dysdercus supersticiosus* F. (Pyrrhocoridae, Heteroptera). Doklady Akademii Nauk 301: 456-458.
- Kuznetsova, V. G. 1989.** The chromosome mechanisms of sex determination in Insecta (with reference to Hemiptera), pp. 293-301. In M. Tonner, T. Soldán and B. Bennetová [eds.], Regulation of insect reproduction. Academia Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences.
- Kuznetsova, V. G., S. Nokkala, & A. Maryanska-Nadachowska. 1997.** Karyotypes, sex chromosome systems, and male meiosis in finnish psyllids (Homoptera: Psylloidea). Folia biologica (Kraków) 45: 143-152.
- La Chance, L. E., M. Degrugillier, & A. P. Leverich. 1970.** Cytogenetics of inherited partial sterility in three generations of the large milkweed bug as related to holokinetic chromosomes. Chromosoma 29: 20-41.
- Lacadena, J. R. 1996.** Citogenética. Editorial Complutense, Madrid.
- Larramendy, M. L., M. Heiskanen, M. Wessman, A. Ritvanen, P. Peltomäki, K. Simola, H. Kääriäinen, H. von Koskull, M. Kähkönen, & S. Knuutila. 1993.** Molecular cytogenetic study of patients with Pallister-Killian syndrome. Human Genetics 91: 121-127.
- Latreille, P. A. 1810.** Considérations générales sur l'ordre naturel des animaux. F. Schoell, Paris.
- Leach, J. G. 1940.** Insect transmission of plant diseases. Mc. Graw Hill, New York.
- Lederer, E. 1938.** Recherches sur les caroténoides des invertébrés. Bull. Soc. Chim. Biol. 20: 567-610.
- Lewin, B. 1994.** Genes V. Oxford University Press, Oxford, England.
- Lewis, K. R., & G. G. E. Scudder. 1958.** The chromosomes of *Dicranocephalus agilis* (Hemiptera-Heteroptera). Cytologia 23: 92-104.
- Lin, J. J., & J. Kuo. 1995.** AFLP: a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. Focus 17: 52-56.
- Linnaeus, C. 1758.** Systema Nature.
- Löve, A., D. Löve, & M. Raymond. 1957.** Cytotaxonomy of *Carex* section Capillares. Canadian Journal of Botany 35: 715-761.
- Luceño, M., A. L. L. Vanzela, & M. Guerra. 1998.** Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. Canadian Journal of Botany 76: 440-449.
- Malheiros, N., D. De Castro, & A. Camara. 1947.** Cromosomas sem centrômero localizado. Agronomia Lusitana 9: 51-74.

- Malheiros-Gardé, N., & A. Gardé. 1950.** Fragmentation as a possible evolutionary process in the genus *Luzula* D. C. *Genética Ibérica* 2: 257.
- Malheiros-Gardé, N., & A. Gardé. 1951.** Agmatoploidia no genero *Luzula* D.C. *Genética Ibérica* 3: 155-176.
- Manna, G. K. 1951.** A study of the chromosomes during meiosis in forty-three species of Indian Heteroptera. *Proceedings of the Zoological Society of Bengal* 4: 1-116.
- Manna, G. K. 1984.** Chromosomes in evolution in Heteroptera, pp. 189-225. *In* A. K. Sharma and A. Sharma [eds.], *Chromosomes in evolution of eukaryotic groups*. CRC Press, Boca Raton Florida USA.
- Manna, G. K., & S. Deb-Mallick. 1981.** Meiotic chromosome constitution in forty-one species of Heteroptera. *Chromosome Information Service* 31: 9-11.
- Marchant, A. D. 1988.** Apparent introgression of mitochondrial DNA across a narrow hybrid zone in the *Caledia captiva* species -complex. *Heredity* 60: 39-46.
- Mendes, L. O. T. 1947.** Sobre a meiose de *Dysdercus mendesi* Bloete (1937) - Hemiptera, Pyrrhocoridae. *Bragantia* 7: 243-256.
- Mendes, L. O. T. 1949.** Observações citológicas em *Dysdercus*. Cadeias de cromossômios em tecido somático de *Dysdercus mendesi* Bloete (Hemiptera-Pyrrhocoridae). *Bragantia* 9: 53-57.
- Menon, P. S. 1955.** On the multiple sex chromosome mechanism in a lygaeid, *Oxycaenus hyalinipennis* (Costa). *Experientia* 11: 483-485.
- Mesa, A., C. S. Fontanetti, & E. Zefa. 1991.** First contribution to the cytogenetics of brazilian Psocoptera. *Brazilian Journal of Genetics* 14: 913-919.
- Meskauskas, A., V. Ksenzenko, M. Shlyapnikov, V. Kryukov, & D. Citavicius. 1985.** 'Red pigment' from ADE-2mutants of *S. cerevisiae* prevents DNA cleavage by restriction endonucleases. *FEBS Letters* 182: 413-414.
- Mikolajski, M. 1965.** Chromosome numbers in *Nabis* Lt. (Heteroptera, Nabidae). *Experientia* 21: 445.
- Mikolajski, M. 1967.** On the multiple sex-chromosome mechanism in *Trapezonotus arenarius* L. (Heteroptera, Lygaeidae). *Experientia* 23: 270-271.
- Mitchell, P. L. 1980.** Host plant utilization by leaf-footed bugs: an investigation of generalist feeding strategy, pp. 226. University of Texas, Austin.
- Modi, W. S. 1993.** Heterogeneity in the concerted evolution process of a tandem satellite array in meadow mice (*Microtus*). *Journal of Molecular Evolution* 37: 48-56.
- Mola, L. M. 1992.** Estudios cromosómicos en libélulas (Orden Odonata), pp. III+184, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Mola, L. M. 1995.** Post-reductional meiosis in *Aeshna* (Aeshnidae, Odonata). *Hereditas* 122: 47-55.
- Mola, L. M., & A. G. Papeschi. 1993.** Meiotic studies in *Largus rufipennis* (Castelnau) (Largidae, Heteroptera): frequency and behaviour of ring bivalents, univalents and B chromosomes. *Heredity* 71: 33-40.
- Mola, L. M., & A. G. Papeschi. 1994.** Karyotype evolution in *Aeshna* (Aeshnidae, Odonata). *Hereditas* 121: 185-189.
- Mola, L. M., & A. G. Papeschi. 1997.** Citogenética de *Dysdercus chaquensis* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 56: 20.
- Montgomery, T. H. 1901a.** A study of the chromosomes of the germ cells of Metazoa. *Transactions of the American Philosophical Society* 20: 154-236.
- Montgomery, T. H. 1901b.** Further studies on the chromosomes of the Hemiptera Heteroptera. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 20: 154-236.
- Montgomery, T. H. 1906.** Chromosomes in the spermatogenesis of the Hemiptera-Heteroptera. *Transactions of the American Philosophical Society* 21: 97-173.
- Moore, L. L., & M. B. Roth. 2001.** HCP-4, a CENP-C-like protein in *Caenorhabditis elegans*, is required for resolution of sister centromeres. *The Journal of Cell Biology* 153: 1199-1207.

- Morrill, C. V. 1910.** The chromosomes in the oogenesis, fertilization and cleavage of coreid Hemiptera. *Biological Bulletin* 19: 79-127.
- Motzko, D., & A. Ruthmann. 1984.** Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. *European Journal of Cell Biology* 33: 205-216.
- Murakami, A., & H. T. Imai. 1974.** Cytological evidence for Holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* 47: 167-178.
- Murray, M. G., & W. F. Thompson. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Nokkala, C. 1985a.** Restriction of kinetic activity of holokinetic chromosomes in meiotic cells and its structural basis. *Hereditas* 102: 85-88.
- Nokkala, S. 1985b.** Restriction of kinetic activity of holokinetic chromosomes in meiotic cells and its structural basis. *Hereditas* 102: 85-88.
- Nokkala, S. 1986.** The mechanisms behind the regular segregation of autosomal univalents in *Calocoris quadripunctatus* (Vil.) (Miridae, Hemiptera). *Hereditas* 105: 199-204.
- Nokkala, S., & C. Nokkala. 1983.** Achiasmatic male meiosis in two species of *Saldula* (Saldidae, Hemiptera). *Hereditas* 99: 131-134.
- Nokkala, S., & C. Nokkala. 1984.** The occurrence of the X0 sex chromosome system in *Dictyonota tricornis* (Schr.) (Tingidae, Hemiptera) and its significance for concepts of sex chromosome system evolution in Heteroptera. *Hereditas* 100: 299-301.
- Nokkala, S., & C. Nokkala. 1996.** The absence of chiasma terminalization and inverted meiosis in males and females of *Myrmus miriformis* Fn. (Corizidae, Heteroptera). *Heredity* 78: 561-566.
- Nokkala, S., & C. Nokkala. 1999.** Chromosomes in two bug species of *Hebrus* (Hebridae, Heteroptera). The occurrence of neo-XY sex chromosome system in Heteroptera. *Caryologia* 52: 27-30.
- Nokkala, S., & S. Grozeva. 2000.** Achiasmatic male meiosis in *Myrmedobia coleoptrata* (Fn.) (Heteroptera, Microphysidae). *Caryologia* 53: 5-8.
- Nordenskiöld, H. 1951.** Cytotaxonomical studies in the genus *Luzula*. I. Somatic chromosomes and chromosome numbers. *Hereditas* 37: 325-355.
- Nordenskiöld, H. 1962.** Studies of meiosis in *Luzula purpurea*. *Hereditas* 48: 503-519.
- Ogawa, K. 1954.** Chromosome studies in the Myriapoda. VII. A chain-association of the multiple sex chromosomes found in *Otocryptops sexspinosus* (Say). *Cytologia* 19: 265-272.
- Oksala, T. 1943.** Zytologische studien an Odonaten. I. Chromosomenverhältnisse bei der gattung *Aeschna* mit besonderer berücksichtigung der postreduktionellen teilung der bivalente. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae* 4: 1-64.
- Oksala, T. 1944.** Zytologische studien an Odonaten. II. Die entstehung der meiotischen präkoazität. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae* 4: 1-37.
- Oksala, T. 1945.** Zytologische studien an Odonaten. III. Die ovogenese. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae* 4: 1-32.
- Oksala, T. 1948.** The concept and mechanism of chromosome reduction. *Hereditas* 34: 104-112.
- Oksala, T. 1952.** Chiasma formation and chiasma interference in Odonata. *Hereditas* 38: 449-480.
- Ortiz, E. 1969.** Chromosomes and meiosis in Dermaptera, pp. 33-43. *In* C. D. Darlington and K. R. Lewis [eds.], *Chromosome Today*, 2. Oliver and Boyd, Edinburgh & London.
- Papeschi, A. G. 1992.** Estudios citogenéticos y evolutivos en Heteroptera, pp. VII+259, Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.



- Papeschi, A. G. 1994.** Chromosome rearrangements in *Belostoma plebejum* (Belostomatidae, Heteroptera). *Caryologia* 47: 223-230.
- Papeschi, A. G., & C. J. Bidau. 1985.** Chromosome complement and male meiosis in four species of *Belostoma* Latreille (Heteropter-Belostomatidae). *Brazilian Journal of Genetics* 8: 249-261.
- Papeschi, A. G., & L. M. Mola. 1990a.** Meiotic studies in *Acanonicus habni* (Stål) (Coreidae, Heteroptera) I. Behaviour of univalents in desynaptic individuals. *Genetica* 80: 31-38.
- Papeschi, A. G., & L. M. Mola. 1990b.** Meiotic studies in *Acanonicus habni* (Stål) (Coreidae, Heteroptera). II. Male chromosome behaviour in a spontaneous inversion mutant. *Genetica* 81: 59-66.
- Parshad, R. 1957a.** Cytological Studies in Heteroptera II. Chromosome complement and meiosis in the males of three pyrrhocorid bugs. *Cytologia* 22: 127-135.
- Parshad, R. 1957b.** Cytological studies in Heteroptera. IV. Chromosome complement and meiosis in twenty six species of the Pentatomoidea, Lygaeoidea and Coreoidea with a consideration of the cytological bearing on the status of these Super-families. *Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University* 133: 521-559.
- Payne, F. 1909.** Some new types of chromosome distribution and their relation to sex. *Biological Bulletin* 16: 119.
- Payne, F. 1910.** The chromosomes of *Archolla multispinosa*. *Biological Bulletin* 18: 174.
- Payne, F. 1912.** I. A further study of the chromosomes of the Reduviidae. II. The nucleolus in the young oocytes and the origin of the ova in *Gelastocoris*. *Journal of Morphology* 23: 331.
- Pendergrast, J. G. 1957.** Studies on the reproductive organs of Heteroptera with a consideration of their bearing on classification. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 109: 1-63.
- Pérez, R., F. Panzera, J. Page, J. A. Suja, & J. S. Rufas. 1997.** Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* 5: 47-56.
- Pérez, R., J. S. Rufas, J. A. Suja, J. Page, & F. Panzera. 2000.** Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* 8: 17-25.
- Peters, W., & M. Kleba. 1971.** Meiotic chromosomes of *Krizousacorixa femorata* (Heteroptera: Corixidae). *Annals of the Entomological Society of America* 64: 965-968.
- Pfaler-Collander, E. v. 1941.** Vergleichend-karyologische untersuchungen an lygaeiden. *Acta Zoologica Fennica* 30: 1-119.
- Pijnacker, L. P., & M. A. Ferwerda. 1972.** Diffuse kinetochores in the chromosomes of the arrhenotokous spider mite *tetranychus urticae* Koch. *Experientia* 28: 354.
- Pimpinelli, S., & C. Goday. 1989.** Unusual kinetochores and chromatin diminution in *Parascaris*. *Trends in Genetics* 5: 310- 315.
- Pinkel, D., T. Straume, & J. W. Gray. 1986.** Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 83: 2934-2938.
- Piza, S. d. T. 1945.** Estudos citologicos em Hemipteros da familia Coreidae. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* 2: 119-148.
- Piza, S. d. T. 1946a.** Comportamento dos cromossômios na meiose de *Euryophthalmus rufipennis* Laporte (Hemiptera-Pyrrhocoridae). *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* 3: 27-54.
- Piza, S. d. T. 1946b.** Aspectos interessantes observados na meiose de alguns Hemípteros. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* 3: 347-362.

- Piza, S. d. T. 1946c.** Nota prévia sobre a meiose de *Corizus (Liorhyssus) hyalinus* (Fabr.) (Hemiptera-Corizidae). Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 3: 141-158.
- Piza, S. d. T. 1946d.** Notas sobre a meiose de *Pachylis* (Hemiptera-Coreidae). Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 3: 55-67.
- Piza, S. d. T. 1947a.** Cromossômios de *Dysdercus* (Hemiptera-Pyrrhocoridae). Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 4: 209-216.
- Piza, S. d. T. 1947b.** Comportamento dos cromossômios sexuais de *Dysdercus mendesi* na segunda divisão dos espermátocitos. Bragantia 7: 269-271.
- Piza, S. d. T. 1951.** Interpretação do typo sexual de "*Dysdercus mendesi*" Blöete (Hemiptera Pyrrhocoridae). Genética Ibérica 3: 107-112.
- Piza, S. d. T. 1953.** The crucial proofs of the dicentricity of Hemiptera chromosomes. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 10: 156-186.
- Piza, S. d. T. 1956.** A note on chromosomes in three coreid bugs. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 31: 32.
- Popescu, P., H. Hayes, & B. Dutrillaux. 2000.** Techniques in Animal Cytogenetics (Principles and practice). Springer-Verlag, Berlin.
- Porter, L. T. 1917.** The spermatocytic divisions of *Leptocoris haematoloma*. Biological Bulletin 33: 316-321.
- Ray-Chaudhuri, S. P., & G. K. Manna. 1955.** Evidence of a multiple sex-chromosome mechanism in a pyrrhocorid bug, *Physopelta schlanbuschi* Fabr. Proceedings of the Zoological Society of Calcutta 8: 65-77.
- Rebagliati, P., L. M. Mola, & A. G. Papeschi. 2001.** Karyotype and meiotic behaviour of the holokinetic chromosomes of six Argentine species of Pentatomidae (Heteroptera). Caryologia 54: 393-347.
- Redi, C. A., S. Garagna, G. Mazzini, & H. Winking. 1986.** Pericentromeric heterochromatin and A-T contents during Robertsonian fusion in the house mouse. Chromosoma 94: 31-35.
- Reineke, A., P. Karlovsky, & P. W. Zebitz. 1998.** Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. Insect Molecular Biology 7: 95-99.
- Richards, O. W., & R. G. Davies. 1983a.** Tratado de Entomología Imms. Clasificación y filogenia. Omega, Barcelona.
- Richards, O. W., & R. G. Davies. 1983b.** Tratado de entomología Imms. Estructura, fisiología y desarrollo. Ediciones Omega S A, Barcelona.
- Riley, R., & C. N. Law. 1965.** Genetic variation in chromosome pairing. Advances in Genetics 13: 57-114.
- Ris, H. 1942.** A cytological and experimental analysis of the meiotic behavior of the univalent X-chromosomes in the bearberry aphid *Tamalia* (= *Phyllaphis*) *coveni* (Ckll.). Journal of Experimental Zoology 90: 267-326.
- Rizzo, H. F. 1976.** Hemipteros de interés agrícola. Chinchas perjudiciales y chinchas beneficiosas para los cultivos. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Rodríguez Gil, S. G., L. M. Mola, A. G. Papeschi, & C. L. Scioscia. 2002.** Cytogenetic heterogeneity in common haplogyne spiders from Argentina (Arachnida, Araneae). Journal of Arachnology 30: 47-56.
- Rufas, J. S., P. Iturra, W. de Souza, & P. Esponda. 1982.** Simple silver staining procedures for the location of nucleolus and nucleolar organizer under light and electron microscopy. Archives de Biologie 93: 267-274.
- Ruthmann, A., & Y. Permantier. 1973.** Spindel und kinetchoren in der mitose und meiose der baumwollwanze *Dysdercus intermedius* (Heteroptera). Chromosoma 41: 271-288.
- Santos, J., C. Sentis, & J. Fernandez-Piqueras. 1987.** Pattern of nucleolar organizer region activity during male meiosis in *Callicrania seoanei* (Orthoptera) as analyzed by silver staining:

- evidences for a possible reactivation in the period between the two meiotic divisions. *Genome* 29: 516-518.
- Schachow, S. D. 1932.** Abhandlungen über haploide chromosomengarnituren inden samendrüsen der Hemiptera. *Anatomischer Anzeiger* 75: 1-46.
- Schaefer, C. W., & P. L. Mitchell. 1983.** Food plants of the Coreoidea (Hemiptera: Heteroptera). *Annals of the Entomological Society of America* 76: 591-615.
- Schilling, P. S. 1829.** Hemiptera Heteroptera Silesiae systematice disposuit. *Beiträge zur Entomologie* 1: 34-92.
- Schlee, D. 1969.** Phylogenetische studien an Hemiptera.
- Scholl, H. 1955.** Ein beitrage zur kenntnis der spermatogenese der Mallophagen. *Chromosoma* 7: 271-274.
- Schrader, F. 1932.** Recent hypothesis on the structure of spindles in the light of certain observations of Hemiptera. *Zeitschrift fuer wiseen schaftliche Zoologie* 142: 520-539.
- Schrader, F. 1940.** The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of *Rhytidolomia senilis* Say (Hemiptera Heteroptera). *Journal of Morphology* 67: 123-141.
- Schrader, F. 1947.** The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the Heteroptera and Homoptera. *Evolution* 1: 134-142.
- Schrader, F. 1953.** Mitosis: the movement of chromosomes in cell division. Columbia University Press, New York.
- Schuh, R. T., & J. Slater. 1995.** True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history. Cornell University Press, New York.
- Shanahan, C. M. 1989.** Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism on the family Buthidae. *Genome* 32: 882-889.
- Slack, H. D. 1939.** The chromosomes of *Cimex*. *Nature* 143: 78.
- Sokal, R. R., & F. J. Rohlf. 1995.** Biometry. W.H. Freeman & Company, New York.
- Solari, A. J. 1979.** Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Tiatoma infestans* (Reduviidae; Hemiptera). *Chromosoma* 72: 225-240.
- Solari, A. J., & S. Agopian. 1987.** Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. *Microscopía Electrónica y Biología Celular* 11: 179-195.
- Stadler, T., C. Meré, & H. L. Cappozzo. 1987.** La bionomía de *Dysdercus albofasciatus* Berg, 1878 (Hemíptera: Pyrrhocoridae), plaga del algodón: su ciclo de vida, alimentación, estrategias adaptativas y enemigos naturales. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas* 13: 143-159.
- Steinhaus, E. A., M. M. Batey, & C. L. Boerke. 1956.** Bacterial symbiotes from the caeca of certain Heteroptera. *Hilgardia* 24: 495-518.
- Strandhede, S. O. 1965.** Chromosome studies in *Eleocharis* subser. *palustres*. I. Meiosis in some forms with 15 chromosomes. *Hereditas* 53: 47-62.
- Stys, P., & I. M. Kerzhner. 1975.** The rank and nomenclature of high taxa in recent Heteroptera. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 72: 64-79.
- Suja, J. A., A. L. del Cerro, J. Page, J. S. Rufas, & J. L. Santos. 2000.** Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosoma* 109: 35-43.
- Suomalainen, E. 1953.** The kinetochore and the bivalent structure in the Lepidoptera. *Hereditas* 39: 88-96.
- Suomalainen, E. 1966.** Achiasmatische oogenese bei Trichopteren. *Chromosoma* 18: 201-207.
- Sweet, M. H. 1964.** The biology and ecology of the Rhyparochrominae of New England (Het.: Lygaeidae), pts. 1 and 2. *Entomologica Americana* 43, 44: 1-24, 1-201.
- Sybenga, J. 1972.** General Cytogenetics. North-Holland Publishing company, Amsterdam.
- Takenouchi, Y., & N. Mutamoto. 1968.** A survey of the chromosome in twenty-three species of heteropteran insects. *Journal of Hokkaido University (Educ. IIB)* 19: 1-19.



- Tanaka, N., & N. Tanaka. 1980.** Chromosome studies in *Chionographis* (Liliaceae). 3. The mode of meiosis. *Cytologia* 45: 809-817.
- Thomas, D. B. 1996.** Role of polyploidy in the evolution of the Heteroptera, pp. 159-178. In C. W. Schaefer [ed.], *Studies on hemipteran phylogeny*. The Entomological Society of America, Vancouver.
- Thomas, D. B. J. 1987.** Chromosome evolution in the Heteroptera (Hemiptera): agmatoploidy versus aneuploidy. *Annals of the Entomological Society of America* 80: 720-730.
- Tombesi, M. L., A. G. papeschi, & L. M. Mola. 1999.** Spermatogenesis in *Bovicola limbata* Gervais, 1844 and *B. caprae* Gurlt, 1843 (Phthiraptera, Ischnocera). *Cytologia* 64: 25-27.
- Toshioka, S. 1934.** On the chromosomes in Hemiptera-Heteroptera. *Dobutsugaku-zasshi* 46: 34-42.
- Toshioka, S. 1935.** On the chromosomes in Hemiptera-Heteroptera. V. On the chromosomes of three species of *Cletus*. (in Japanese). *Dobutsugaku-zasshi* 47: 637-644.
- Ueshima, N. 1963a.** Chromosome study of *Thyanta pallidovirens* (Stål) in relation to taxonomy (Hemiptera: Pentatomidae). *The Pan-Pacific Entomologist* 39: 149-154.
- Ueshima, N. 1963b.** Chromosome behavior of the *Cimex pilosellus* complex (Cimicidae: Hemiptera). *Chromosoma* 14: 511-521.
- Ueshima, N. 1966a.** Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97-122.
- Ueshima, N. 1966b.** Cytology and cytogenetics, pp. 183-237. In R. L. Usinger [ed.], *Monograph of Cimicidae*. Thomas Say Foundation Entomology Society of America.
- Ueshima, N. 1979.** Hemiptera II: Heteroptera. John, B, Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart.
- Ueshima, N., & P. D. Ashlock. 1980.** Cytotaxonomy of the Lygaeidae (Hemiptera - Heteroptera). *The University of Kansas Science Bulletin* 51: 717-801.
- van Doesburg, P. H. 1968.** A revision of the New World species of *Dysdercus* Guérin Méneville (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *Zoologische Verhandelingen* 97: 1-215.
- Van Duzee, E. P. 1916.** Check list of the Hemiptera of America north of Mexico. New York Entomological Society.
- Vidal, O. R., & I. M. Lacau. 1985.** Los cromosomas de *Euryptalmus fasciatus* Blanchard (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Physis Secc. C*, 43: 13-17.
- Vogelstein, B., & D. Gillespie. 1979.** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 76: 615-619.
- Wahl, H. A. 1940.** Chromosome numbers and meiosis in the genus *Carex*. *American Journal of Botany* 27: 458-470.
- White, M. J. D. 1973.** Animal cytology and evolution. Cambridge University Press, London.
- White, M. J. D. 1979.** Modes of speciation. Freeman, San Francisco.
- Wilson, E. B. 1905a.** Studies on chromosomes. II. The paired microchromosomes, idiochromosomes and heterotropic chromosomes in Hemiptera. *Journal of Experimental Zoology* 2: 507-545.
- Wilson, E. B. 1905b.** Studies on chromosomes. I. The behavior of the idiochromosomes in Hemiptera. *Journal of Experimental Zoology* 2: 371-405.
- Wilson, E. B. 1906.** Studies on chromosomes. III. The sexual difference of the chromosome groups in Hemiptera, with some considerations on the determination and inheritance of sex. *Journal of Experimental Zoology* 3: 1-40.
- Wilson, E. B. 1907a.** Differences in the chromosome groups of closely related species and varieties, and their possible bearing on the "physiological species", pp. 347-348, *Proceedings of the International Congress of Zoology*, Boston.
- Wilson, E. B. 1907b.** The case of *Anasa tristis*. *Science* 25: 191-193.
- Wilson, E. B. 1909a.** Studies on chromosomes. IV The "accessory" chromosome in *Syromastes* and *Pyrrhocoris* with a comparative review of the types of sexual differences of the chromosome groups. *The Journal of Experimental Zoology* 6: 69-99.

- Wilson, E. B. 1909b.** The female chromosome groups in *Syromastes* and *Pyrrhchoris*. Biological Bulletin 16: 199-204.
- Wilson, E. B. 1909c.** Studies on chromosomes. V. The chromosomes of *Metapodius*. A contribution to the hypothesis of the generic continuity of chromosomes. Journal of Experimental Zoology 6: 147-205.
- Wilson, E. B. 1910.** Studies on chromosomes. VI. A new type of chromosome combination in *Metapodius*. Journal of Experimental Zoology 9: 53-78.
- Wilson, E. B. 1911.** Studies on chromosomes. VII. A review of the chromosomes of *Nezara*; with some more general considerations. Journal of Morphology 22: 71-110.
- Wilson, E. B. 1912.** Studies on chromosomes. VIII. Observations on the maturation phenomenon in certain Hemiptera and other forms, with considerations on synapsis and reduction. Journal of Experimental Zoology 13: 345-431.
- Wilson, E. B. 1925.** The cell in development and heredity. MacMillan, New York.
- Wilson, E. B. 1932.** Polyploidy and metaphase patterns. Journal of Morphology 53: 443-471.
- Wolf, K. W., K. Novák, & F. Marec. 1997.** Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera with small chromosome numbers. Heredity 79: 135-143.
- Wolfe, S. L., & B. John. 1965.** The organization and ultrastructure of male meiotic chromosomes in *Oncopeltus fasciatus*. Chromosoma 17: 85-103.
- Xavier, A. D. C. M. 1945.** Cariologia comparada de laguns Hemipteros Heteropteros (Pentatomoideos e Coreideos). Memorias e estudos do Museu Zoologico da Universidade de Coimbra 163: 1-105.
- Yosida, T. 1946.** A chromosome survey in 20 species of Heteroptera insects, with special reference to the morphology of sex-chromosomes. I. (in Japanese). La Kromosomo 2: 57-63.
- Yosida, T. 1950.** Unusual type of the nucleolus observed in a bug, *Acanthocoris sordidus*. Journal Faculty of Sciences Hokkaido University (Zoology) 9243-249.
- Ziegler, I., & R. Harmsen. 1969.** The biology of pteridines in insects. Advances in Insect Physiology 6: 139-203.